Über Pepsinglutinpepton.

Ein Beitrag zur Kenntnis der Abbauprodukte des Eiweiß.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen philosophischen Fakultät

der

Universität Leipzig

vorgelegt von

Heinrich Schmitz

aus **Elberfeld.**

ACAD.
LUGD.BAT
BIBL.

Weida i. Th.
Druck von Thomas & Hubert
Spezialdruckerei für Dissertationen
1909.

Angenommen von der mathematisch-naturwissenschaftlichen Sektion auf Grund der Gutachten der Herren

Beckmann und **Hantzsch.**

Leipzig, den 7. Dezember 1909.

Der Procancellar.

Rohn.

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit.

Die vorliegende Arbeit wurde im chemischen Laboratorium des physiologischen Institutes der Universität Leipzig ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. M. Siegfried,

möchte ich auch an dieser Stelle für die Anregung zu der Arbeit, sowie für die vielen Ratschläge und Belehrungen meinen innigsten Dank aussprechen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545810_0021

Inhaltsübersicht.

Seite

Einleitung 9
Aufgabe der Arbeit 10
Eigene Untersuchungen 12
A. Darstellung und Charakterisierung des Pepsinglutinpeptons . . 12
a) Peptische Verdauung der Gelatine 12
b) Kontrolle der Verdauung 12
c) Einfluß der Salzsäure bei der Pepsinverdauung 13
d) Isolierung des Pepsinglutinpeptons 15
e) Bemerkungen zu den einzelnen Peptondarstellungen 17
f) Eigenschaften der isolierten Produkte 18
1. Optische Drehung und Analyse 18
Barytsalz 20
B. Anwendung der Karbaminoreaktion auf das Glutinpepton . . . 22
a) 1. Fraktionierung des Peptons durch die Karbaminofällung . 23
b) 2. Fraktionierung 25
c) Fraktionierung eines Peptongemisches 31
d) Bestimmung des Quotienten $CO_2 : N$ 32
1 Für Pepsinglutinpepton 35
2. Für die Spaltungsprodukte desselben 37
C. Derivate des Pepsinglutinpeptons 38
a) β-Naphtalinsulfopepsinglutinpepton 41
b) 4-Nitrotoluol-2-sulfosäurepepsinglutinpepton 42
c) Spaltungsversuche dieser Derivate 42
D. Spaltungen des Pepsinglutinpeptons 46
a) Stickstoffverteilung im Molekül 47
b) Qualitative und quantitative Spaltung des Pepsinglutinpeptons 50
c) 3. Spaltung 68
d) Ergebnisse der Spaltungen 74
Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse der Untersuchung . . 77

Einleitung.

Bei der Bedeutung, die die Proteinstoffe bei allen chemischen Prozessen im lebenden Organismus haben, kann es nicht Wunder nehmen, daß man von der Aufklärung ihrer Struktur die wichtigsten Aufschlüsse für die biologische Chemie erwartet. Während man noch bis vor wenigen Jahrzehnten annahm, daß ein erfolgreiches Arbeiten auf diesem Gebiete durch die komplizierte Zusammensetzung und durch die in bezug auf ihre physikalischen Eigenschaften nicht immer leicht zu verarbeitenden Körper, der weiteren Forschung stets unüberwindliche Schwierigkeiten bereiten würde, so haben doch die großen Erfolge gezeigt, daß sich auch die Schwierigkeiten, zum Teil wenigstens, überwinden lassen.

Trotz alledem sind die Kenntnisse über die Konstitution der Eiweißkörper auch heute noch ziemlich gering. Genauer untersucht sind hauptsächlich die Hydrolysen, die einerseits durch Säuren und Alkalien, andrerseits durch Verdauungsfermente bewirkt werden. Dabei zerfallen die Eiweißkörper zunächst in die Albumosen und Peptone, die noch Eiweißkörper in weiterem Sinne sind. Sie geben noch die chemischen Reaktionen der Eiweißkörper, während ihnen die physikalischen Eigenschaften fehlen.

Neben den Albumosen und Peptonen entstehen einige der jetzt von E. Fischer[1]) synthetisch dargestellten Peptide und Aminosäuren.

Der Übergang von den nativen Eiweißkörpern zu den Aminosäuren erfolgt ganz allmählich. Es gibt also zwischen der zuerst gebildeten Albumose, die dem ursprünglichen Eiweiß noch am nächsten steht, und dem sich zuletzt bildenden Pepton eine ganze

[1]) Berl. Ber. **34**, 2868 (1901); **35**, 1095, 3226 (1902). Ausführliche Literatur siehe: Emil Fischer, Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine.

Reihe von Zwischenstufen. Früher nannte man alle diese dabei entstehenden Körper Peptone. Kühne[1]) stellte eine Einteilung auf, die auch heute noch gültig ist. Albumosen sind demnach diejenigen löslichen Spaltungsprodukte des Eiweiß, die durch irgend welche Salze ausgesalzen, Peptone diejenigen, die nicht ausgesalzen werden können.

Bei der Darstellung ihrer Peptone verwandten W. Kühne und R. H. Chittenden[1]) zur Trennung von den Albumosen Ammonsulfat. Später fanden A. Börner und K. Baumann,[2]) daß sich hierzu auch Zinksulfat eigne. Kupfer- und Bleisalze wurden von Folin[3]) als Trennungsmittel empfohlen.

Reine Peptone wurden jedoch bei Anwendung dieser Methoden nicht erhalten. Erst Siegfried[4]) gelang es mit Hilfe seiner Eisenmethode einheitliche Produkte darzustellen.

Von den von Siegfried[5]) und seinen Schülern[6]) isolierten Peptonen hat das Pepsinglutinpepton als relativ einfachstes besonderes Interesse.

Herr Professor Siegfried forderte mich daher auf, die von Scheermesser[7]) begonnene Untersuchung dieses Peptons fortzusetzen.

Aufgabe der Untersuchung.

Dabei handelt es sich zunächst darum, neue in der Eiweißchemie inzwischen aufgekommene Methoden, wie die der Karbaminoreaktion,[8]) die der Naphtalinsulfochlorid[9]) und der Orthonitro-

[1]) W. Kühne u. R. H. Chittenden, Ztschr. f. Biologie **20,** 11 (1884); W. Kühne, Verh. d. naturhist. med. Ver. zu Heidelberg N. F. **3,** 286 (1885).

[2]) A. Börner u. K. Baumann, Ztschr. f. analyt. Chem. **34,** 562 (1898); A. Börner, Ztschr. f. Unters. d. Nahrgs.- u. Genußm. **1,** 106 (1898).

[3]) Folin, Ztschr. f. physiol. Chem. **25,** 152 (1898).

[4]) M. Siegfried, Ztschr. f. physiol. Chem. **27,** 335 (1899); **35,** 164 (1902); Berl. Ber. **33,** 2859 (1900).

[5]) Ztschr. f. physiol. Chem. **35,** 43, 45 (1902).

[6]) P. Mühle, Amphopepton, Inaug.-Diss., Leipzig 1901; F. Müller, Ztschr. f. physiol. Chem. **38,** 265 (1903); C. Borkel, ibid. **38,** 289 (1903); F. Krüger, ibid. **38,** 320 (1903); F. W. Scheermesser, ibid. **41,** 61 (1904).

[7]) W. Scheermesser, Ztschr. f. physiol. Chem. **41,** 61 (1904).

[8]) M. Siegfried, Ztschr. f. physiol. Chem. **44,** 86 (1904); Berl. Ber. **39,** 297 (1906).

[9]) E. Fischer, Berl. Ber. **35,** 3779 (1902).

toluolsulfochlorid[1]) auf das Pepsinglutinpepton anzuwenden. Ferner sollte versucht werden, neue Schritte zur Aufklärung der Konstitution zu tun. Vor allen Dingen aber sollte zuerst, namentlich mit Hilfe der fraktionierten Karbaminofällung die Einheitlichkeit des Peptons geprüft werden. Denn nachdem es gelungen war durch diese Methode zu beweisen, daß einerseits die Protoalbumose Picks[2]) und andere Albumosegemische keine einheitlichen Körper sind, daß aber andrerseits die Trypsinfibrinpeptone[3]) wohl charakterisierte einheitliche Peptone sind, so war auch in diesem Falle anzunehmen, daß die fraktionierte Karbaminofällung ein wichtiges Argument für oder gegen die Einheitlichkeit des Pepsinglutinpeptons sei.

[1]) M. Siegfried, Ztschr. f. physiol. Chem. **42**, 68 (1904).
[2]) F. J. Birchard, Inaug.-Diss., Leipzig 1909.
[3]) E. Hitschmann, Inaug.-Diss., Leipzig 1907.

Eigene Untersuchungen.

A. Darstellung und Charakterisierung des Pepsinglutinpeptons.

a) Verdauung der Gelatine.

Beste Ledergelatine (Theuerkauf & Scheibner) diente mir als Ausgangsmaterial zur Gewinnung des Glutinpeptons.

1 kg hiervon wurde während 24 Stunden in Wasser eingeweicht und dann verschiedentlich gut ausgewaschen. Bei den späteren Darstellungen habe ich das Reinigen der Gelatine unterlassen. Ich halte es deshalb nicht für nötig, weil durch die vielen Fällungen und Umfällungen, denen die Darstellung des Peptons unterworfen ist, sicherlich die etwa vorhandenen löslichen Verunreinigungen (Zucker und Glyzerin) entfernt werden.

Die Gelatine wurde dann in Wasser von 70—80° gelöst, mit Wasser auf 15 Liter aufgefüllt, und diese Lösung in dem Siegfriedschen Verdauungsapparat bei konstanter Temperatur (40°) und bei fortgesetztem Rühren verdaut, wodurch eine möglichst gleichmäßige Einwirkung des Enzyms bewirkt wird.

Dieser Flüssigkeit wurden 240 ccm einer 25 %igen Salzsäure zugesetzt, sodaß der Gehalt daran 0,4 % betrug. Zur Verdauung wurden von fünf zu fünf Tagen 5 g sog. „Pepsin puriss. Dr. G. Grübler" hinzugefügt. Zwecks Sterilhaltung wurde täglich soviel Toluol zugesetzt, daß der Geruch darnach stets deutlich wahrzunehmen war.

Äußerlich schon machte sich der Fortschritt der Verdauung in der Weise bemerkbar, daß nach einigen Tagen die bis dahin trübe Flüssigkeit vollkommen klar wurde.

b) Kontrolle der Verdauung.

Um zu sehen, ob die Verdauung auch weiter fortschritt, entnahm ich von Zeit zu Zeit (zum ersten mal nach 8 Tagen)

eine Probe von 20 ccm aus der Verdauungsflüssigkeit und salzte dieselbe bei saurer neutraler und ammoniakalischer Reaktion mit Ammonsulfat aus. Es wurde von den abgeschiedenen Albumosen filtriert, und von der klaren neutralisierten Flüssigkeit 10 ccm in eine Stöpselflasche gebracht. Aus einer Bürette ließ ich tropfenweise eine Lösung hinzufließen, die bestand aus:

10 g Eisenammoniakalaun,
200 g Ammonsulfat,
250 ccm Wasser.

Es bildete sich hierbei der Eisenniederschlag des schon gebildeten Peptons. Das Ende der Titration erkannte ich daran, daß ein aus der zu filtrierenden Flüssigkeit genommener Tropfen eine Rhodankalilösung rötete.

Es wurden an ccm der oben angegebenen Eisenlösung verbraucht:

am	8. XI.	0,8 ccm	
„	13. XI.	1,1 „	
„	19. XI.	1,7 „	
„	22. XI.	1,8 „	
am	25. XI.	1,9 ccm	
„	27. XI.	2,0 „	
„	30. XI.	2,0 „	

Der Zusatz an Salzsäure wurde in der Weise geregelt, daß fast täglich mit Kongopapier geprüft wurde. War die Färbung verschwunden oder nur ganz schwach, so wurde wieder etwas Salzsäure bis zur schwachen Bläuung zugesetzt.

c) Einfluß der Salzsäure bei der Pepsinverdauung.

Scheermesser[1]) beschäftigte sich mit dem Versuch, nachzuweisen, in welchem Grade die Salzsäure bei der Pepsinverdauung verbraucht würde. Er fand, daß zu Beginn der Verdauung ein verhältnismäßig rapider Verbrauch an Salzsäure stattfand, der jedoch allmählich immer mehr abnahm, um zum Schluß vollkommen zu verschwinden. Es lag also die Vermutung nahe, anzunehmen, daß sich vielleicht durch einen ständig größeren Zusatz von Salzsäure auch eine bessere Ausbeute an Pepton erzielen lasse.

---

[1]) Fr. W. Scheermesser, Inaug.-Diss., Leipzig 1903, S. 17; Ztschr. f. physiol. Chem. **41**, 61 (1904).

Zur genaueren Untersuchung diente eine kleinere Menge einer Glutinlösung, die dieselben Konzentrationsverhältnisse aufwies, wie die bereits vorher im großen verdaute:

20 g Gelatine (der 50. Teil der I. Verd.) wurden in Wasser von 70—80° gelöst und auf 30 ccm aufgefüllt. Diese Lösung wurde 0,4 % salzsauer gemacht und zu ihrer Sterilhaltung etwas Toluol hinzugegeben. Von 5 zu 5 Tagen wurde dann 0,1 g Pepsin hinzugefügt. Die die Lösung enthaltende Flasche, die von Zeit zu Zeit heftig umgeschüttelt wurde, befand sich in einem Wärmschrank, dessen Temperatur durch einen Thermostaten auf 37° gehalten wurde.

Täglich wurde mit Nissl-Kongopapier geprüft. Schon am 3. Tage zeigte sich nur noch ganz schwache Bläuung, ein Zeichen dafür, daß die zugesetzte Salzsäure schon gebunden war. Es wurde daher zur Verdauungslösung soviel einer 2 %igen Salzsäure hinzugegeben, daß der ganze Gehalt daran 0,3 % betrug. Nach weiteren 8 Tagen war abermals die Salzsäure verbraucht, worauf die ganze Flüssigkeit 0,2 % und schließlich nach weiteren 12 Tagen (da abermaliger Verbrauch der Salzsäure eingetreten war) 0,1 % salzsauer gemacht wurde. Ein wesentlicher weiterer Verbrauch an Salzsäure war jetzt nicht mehr festzustellen. Genau wie bei der vorher in großem Maße angesetzten Verdauung so wurde auch hier von Zeit zu Zeit aus der Verdauungsflüssigkeit eine Probe von 20 ccm entnommen, dieselbe mit Ammonsulfat bei saurer neutraler und ammoniakalischer Reaktion ausgesalzen, von den Albumosen filtriert und 10 ccm mit der Eisenammoniaklösung, deren Konzentrationsverhältnisse schon vorher (S. 13) beschrieben sind, titriert.

Nr.	Zeit nach	Reaktion	Anzahl der verbrauchten ccm		Anzahl der beim Probeversuch mehr verbrauchten ccm
			bei der I. Darstellung	bei dem Probeversuch	
1	8 Tagen	neutral	0,8	0,7	−0,1
2	13 „		1,1	1,3	+0,2
3	19 „		1,7	2,2	+0,5
4	22 „		1,8	2,5	+0,7
5	25 „		1,9	2,8	+0,9
6	27 „		2,0	3,0	+1,0
7	30 „		2,0	3,2	+1,2
8	33 „		—	3,2	

Während bei der ersten Verdauung nach vierwöchentlicher Einwirkung des Enzyms nur 2 ccm der Eisenlösung verbraucht wurden, waren bei dem Probeversuch zur vollständigen Fällung des Peptons 3,2 ccm erforderlich; ein Zeichen also, daß durch den ständig größeren Zusatz von Salzsäure sich auch eine wesentlich größere Ausbeute von Pepton erzielen läßt; eine Tatsache, die auch durch die späteren Verdauungsversuche bestätigt wurde.

d) Isolierung des Pepsinglutinpeptons.

Nach Beendigung der Verdauung der Gelatine, was, wie ich bereits bemerkt, leicht festzustellen war in der geringen Zunahme des Verbrauchs der Eisenlösung, wurde die Verdauungslösung direkt im Verdauungsapparat bei 40° mit Ammonsulfat gesättigt. Hierzu waren ungefähr 13 kg erforderlich. Nach zwölfstündigem Rühren wurde erkalten lassen. Die Albumosen, die sich zum größten Teil in Form einer klebrig braunen Masse am Rührer zusammengeballt hatten, wurden mechanisch entfernt. Von den noch vorhandenen minimalen Albumoseresten wurde filtriert. Das nun vollkommen klare Filtrat gab weder auf Zusatz von Schwefelsäure (konzentrierte H_2SO_4 gesättigt mit gleichen Teilen Ammonsulfatlösung) noch auf Zusatz von (mit Ammonsulfat gesättigtem) Ammoniak eine weitere Abscheidung von Albumosen.

In diese Lösung wurde nun nach dem Neutralisieren so lange fein gepulverter Eisenammoniakalaun eingetragen, bis eine filtrierte Probe mit einer verdünnten Lösung desselben keinen Niederschlag mehr gab, hingegen mit Rhodankalium eine deutliche Braunfärbung zeigte. Zur vollständigen Fällung des Pepton-Eisen-Niederschlages waren ungefähr 100 g Eisenammoniakalaun erforderlich. Es wurde absitzen lassen, filtriert und der Niederschlag so lange mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, bis die Waschflüssigkeit nur noch eine sehr schwache Chlorreaktion gab. Dieser Niederschlag wurde unter Zusatz von etwas Schwefelsäure in 2 Liter Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurde so lange konzentrierter Ammoniak hinzugefügt, bis deutlicher Geruch darnach wahrzunehmen war. Das Eisen wurde so als Hydroxyd gefällt, während das Pepton in Lösung bleibt. Von dem gefällten Eisenhydroxyd wurde filtriert und der Niederschlag bis zum Ver-

schwinden der Biuretreaktion mit warmem Wasser gewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt, mit Schwefelsäure neutralisiert und bei 40° mit Ammonsulfat gesättigt. Es wurde erkalten lassen und nach 24 Stunden von den abgeschiedenen Restalbumosen filtriert. Eine weitere Abscheidung an Albumosen in saurer, neutraler und ammoniakalischer Lösung fand auch hier nicht statt.

In der nun völlig albumosefreien Lösung wurde die Fällung des Pepton-Eisen-Niederschlags wiederholt. Der Verbrauch an Eisenammoniakalaun betrug diesmal 70 g.

Die schwefelsaure Peptonlösung wurde zur Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt in nicht zu großem Überschuß versetzt und das Filtrat mit Ammonkarbonatlösung vom überschüssigen Baryt befreit.

Die, außer Ammonkarbonat, nur Pepton enthaltende Flüssigkeit wurde im Vakuum bis zum dickflüssigen Sirup eingedampft, der beim Erkalten zum größten Teil zu einer weißen Masse erstarrte.

Dieser Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und zu dieser konzentrierten Peptonlösung so lange absoluter Alkohol hinzugefügt, bis eben bleibende Trübung entstand. Unter ständigem lebhaftem Rühren mit Hilfe eines Motors wurde dieses Gemisch in 4 kg absoluten Alkohol (90—100fache Menge) eingetragen; dabei schied sich das Pepton in weißen Flocken ab, die sich leicht absetzten und gut filtrieren ließen. Das Pepton wurde auf der Nutsche gut mit Alkohol gewaschen und dann im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

Ausbeute: 30 g.

Dieses Pepton wurde nochmals aus Alkohol umgefällt. Der wässrigen Lösung wurde so viel Alkohol hinzugefügt, daß das Verhältnis an:

Pepton : Wasser : Alkohol
10 : 15 : 5 war.

Beim Einrühren in abermals 4 kg absoluten Alkohol erwies sich dieses Lösungsverhältnis jedoch als zu konzentriert. Das abgeschiedene Pepton ballte sich in Form einer schmierigen weißen Masse am Boden des Gefäßes und am Rührer fest. Der Peptonlösung wurde deshalb noch fast das gleiche Volumen

Wasser hinzugefügt, Alkohol bis zur bleibenden Trübung zugesetzt und das Pepton gefällt. Da sich auch nach dreiwöchentlichem Stehen nur ein Teil des Peptons abgesetzt hatte, so half ich mir beim Filtrieren in der Weise, daß ich zuerst den Niederschlag aufs Nutschenfilter brachte, wodurch ein klares Filtrieren innerhalb weniger Tage ermöglicht wurde.

Ausbeute: 25 g.

Was das Absitzen des in Alkohol gefällten Peptons anbelangt, so bin ich durch die vielen Beobachtungen zu der Überzeugung gekommen, daß ein Pepton, je reiner es ist, um so feinverteilter ausfällt und sich dementsprechend auch um so schwieriger absetzt.

e) Bemerkungen zu den übrigen Peptondarstellungen.

II. Darstellung.

Verdaut wurde: 1 kg Gelatine in
15 l Wasser mit
30 g Pepsin

bei 0,4; 0,3; 0,2; 0,1% HCl.

Bei dieser und den folgenden Verdauungen wurde der Salzsäurezusatz in derselben Weise gehandhabt, wie er vorher (S. 14) bei der Probeverdauung beschrieben. Auch hier wurde die Annahme bestätigt, daß durch den ständig größeren Zusatz an Salzsäure eine bessere Ausbeute an Pepton sich erzielen lasse.

Eine Schwierigkeit lag bei diesen Darstellungen in der Entfernung der Rest-Albumosen. Dieselben schieden sich bei saurer, neutraler und ammoniakalischer Reaktion jedesmal in Form einer gelinden Trübung ab. Beim Filtrieren bildete dieselbe auf dem Filter schnell eine klebrige Schicht, die den Hindurchgang der Flüssigkeit fast vollständig hinderte.

Ich half mir deshalb durch einen Kunstgriff: Papierschnitzel wurden mit gesättigter Ammonsulfatlösung zu einem Brei verkocht, dieser in die trübe Lösung eingetragen und mit einem Motor kräftig gerührt. Schon nach einer halben Stunde war dieselbe vollkommen klar. Die Albumosen hatten sich zusammengeballt und hafteten mit dem Papierbrei fest am Rührer.

Die Ausbeute dieser Darstellung betrug 40 g.

III. Darstellung.

Verdaut wurde bei 40° während 28 Tagen bei 0,4; 0,3; 0,2; 0,1% HCl.

1 kg Gelatine in
15 l Wasser mit
30 g Pepsin Dr. Grübler.

Die Verdauung und Darstellung wurde genau in derselben Weise wie bei der vorhergehenden durchgeführt.

Die Ausbeute betrug nach dem Umfällen 35 g.

IV. Darstellung.

Verdaut wurde

1 kg Gelatine in
15 l Wasser mit
30 g Pepsin Dr. Grübler,

während 30 Tagen bei 40° Temperatur und 0,4; 0,3; 0,2; 0,1% HCl.

Ausbeute nach dem Umfällen: 35 g.

f) Eigenschaften des isolierten Produktes.

Nach dem Trocknen im evakuierten Exsikkator stellte das Pepton ein rein weißes amorphes Pulver dar. Zur Identifizierung mit dem schon früher dargestellten Pepsinglutinpepton wurde der Kohlenstoff-Wasserstoff-Stickstoffgehalt, die optische Drehung sowie der Baryumgehalt des Barytsalzes bestimmt.

Jede zur Untersuchung bestimmte Peptonmenge wurde im Siegfriedschen Trockenapparat, in dessen Mantel Alkohol gefüllt wurde, bei 75° (Temperatur des siedenden Alkohols)[1]) bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Dies nahm bei ununterbrochenem Erhitzen etwa vier bis fünf Tage in Anspruch.

Zur Bestimmung der optischen Drehung wurde das Pepton in wenig Wasser gelöst, die Lösung auf 20 ccm aufgefüllt und im 1 oder 2 dcm-Rohr im „Lippichschen Halbschattenapparat" polarisiert.

Zur Darstellung der Barytsalze wurde die zur Polarisation benutzte Lösung verwendet, und zwar in der Weise, daß zu derselben Barytwasser hinzugefügt, Kohlensäure bis zur neutralen

[1]) Im Inneren des Apparates gemessen.

Reaktion eingeleitet und dann aufgekocht wurde. Das Filtrat wurde direkt im Platintiegel eingedampft, bei 70—80° im Trockenschrank bis zum konstanten Gewicht getrocknet, gewogen und hierauf mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure abgeraucht.

Pepton der I. Darstellung.

$c = 3{,}1420$
$\alpha = -2{,}56°$
$(\pm 0{,}01)$ $\quad [\alpha_D]^{20} = -81{,}47°$
$t = 20°$
$l = 1$ dcm

$c = 1{,}7540$
$\alpha = -1{,}44°$
$(\pm 0{,}02)$ $\quad [\alpha_D]^{20} = -82{,}10°$
$t = 20°$
$l = 1$ dcm.

0,3328 g Pepton verbrauchten 41,2 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
$N = 17{,}23\,\%$.

0,2250 g Pepton verbrauchten 27,5 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
$N = 17{,}11\,\%$.

0,1868 g Pepton gaben 0,3270 g CO_2 und 0,1120 g H_2O.
$C = 47{,}74\,\%$; $H = 6{,}71\,\%$.

0,1141 g Pepton gaben 0,1996 g CO_2 und 0,0708 g H_2O.
$C = 47{,}71\,\%$; $H = 6{,}94\,\%$.

Pepton der II. Darstellung.

$c = 1{,}9300$
$\alpha = -1{,}57°$
$(\pm 0{,}02)$ $\quad [\alpha_D]^{20} = -81{,}35°$.
$t = 20°$
$l = 1$ dcm.

0,2604 g Pepton verbrauchten 32,1 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
$N = 17{,}25\,\%$.

0,2466 g Pepton verbrauchten 30,1 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
$N = 17{,}04\,\%$.

0,1820 g Pepton gaben 0,3181 g CO_2 und 0,1098 g H_2O.
C = 47,67 %; H = 6,75 %.

0,1244 g Pepton gaben 0,2166 g CO_2 und 0,0734 g H_2O.
C = 47,49 %; H = 6,51 %.

Pepton der III. Darstellung.

c = 0,1747
α = — 2,84°
(± 0,01) $[\alpha_D]^{20}$ = — 81,28°
t = 20°
l = 2 dcm.

0,3468 g Pepton verbrauchten 43,5 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
N = 17,56 %.

0,2968 g Substanz gaben 0,5195 g CO_2 und 0,1698 g H_2O.
C = 47,74 %; H = 6,48 %.

Pepton der IV. Darstellung.

c = 0,1485
α = — 2,44°
(± 0,02) $[\alpha_D]^{20}$ = — 82,15°.
t = 20°
l = 2 dcm.

0,1294 g Pepton verbrauchten 16,2 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
N = 17,53 %.

0,1286 g Pepton gaben 0,2162 g CO_2 und 0,0776 g H_2O.
C = 47,49 %; H = 6,85 %.

0,1520 g Substanz gaben 0,2658 g CO_2 und 0,0910 g H_2O.
C = 47,69 %; H = 6,70 %.

Baryumsalz.

0,3418 g Barytsalz (Pepton I. Darstellung) gaben 0,0583 g $BaSO_4$.
Ba = 10,05 %.

0,6526 g Ba-Salz (Pepton I. Darstellung) gaben 0,1080 g $BaSO_4$.
Ba = 9,75 %.

0,0852 g Ba-Salz (Pepton II. Darstellung) gaben 0,0142 g $BaSO_4$.
Ba = 9,81 %.

0,0778 g Ba-Salz (Pepton II. Darstellung) gaben 0,0134 g $BaSO_4$.

$Ba = 10{,}13\,\%$.

0,4910 g Ba-Salz (Pepton III. Darstellung) gaben 0,0850 g $BaSO_4$.

$Ba = 10{,}19\,\%$.

0,4206 g Ba-Salz (Pepton IV. Darstellung) gaben 0,0708 g $BaSO_4$.

$Ba = 9{,}91\,\%$.

Zusammenstellung der Resultate.

Darstellung	Optische Drehung	% N	% C	% H
I	— 81,47°	17,33	47,74	6,71
	— 82,10°	17,11	47,71	6,94
II	— 81,35°	17,25	47,67	6,75
		17,04	47,49	6,51
III	— 81,28°	17,56	47,74	6,40
IV	— 82,15°	17,53	47,49	6,85
			47,69	6,70
Im Mittel:	— 81,67	17,30	47,65	6,69

Aus der Analyse berechnet als einfachste Formel für das Pepsinglutinpepton:

$$C_{23} \cdot H_{39} \cdot N_7 \cdot O_{10},$$

aus welcher sich dann berechnet:

$$N = 17{,}13\,\%;\ C = 48{,}22\,\%;\ H = 6{,}67\,\%.$$

Baryumsalz.

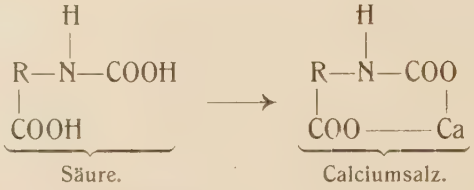
	I. Darstellg.	II. Darstellg.	III. Darstellg.	IV. Darstellg.	Im Mittel
% Ba	10,05	9,81	10,19	9,91	9,97
	9,75	10,13			

Berechnet: $Ba = 10{,}65\,\%$.

B. Anwendung der Karbaminoreaktion auf das Pepsinglutinpepton.

Nachdem Siegfried[1]) die Beobachtung gemacht hatte, daß beim Einleiten von Kohlensäure in eine Lösung von Baryt und Glykokoll erst nach längerem Stehen oder beim Erwärmen ein Niederschlag entsteht, der doch eigentlich sofort erfolgen müßte, erbrachte er nach eingehender Untersuchung dieser Erscheinung zuerst den Nachweis der Existenz von Salzen der Karbaminsäuren.

Bei dieser Reaktion verliert der Amidkörper vollkommen seine amphoteren Eigenschaften und nimmt den Charakter einer starken zweibasischen Säure an:



Säure. Calciumsalz.

Genau wie die Amidosäuren zeigen auch die Eiweißkörper selbst sowohl wie die eiweißähnlichen Spaltungsprodukte amphoteren Charakter. Es war deshalb auch anzunehmen, daß sie sich in bezug auf Bildung von karbaminsauren Salzen genau wie Amidosäuren verhalten würden. Daß dies der Fall ist wurde bald bestätigt und zwar von R. Adler[2]) für Pepsinpepton, F. J. Birchard[3]) für die Albumosen und von E. Hitschmann[4]) für die Trypsinfibrinpeptone α und β.

Untersuchungen M. Siegfrieds[5]) und H. Liebermanns[5]) zeigten, daß die Karbaminate der einzelnen Aminosäuren verschiedene Löslichkeit besitzen.

In dieser verschiedenen Löslichkeit nun war ein neues Mittel gegeben, ein Gemisch von Aminokörpern zu trennen, oder aber,

[1]) M. Siegfried, Über Bindung von Kohlensäure durch amphotere Amidokörper. Ztschr. f. physiol. Chem. **44**, 86 (1904).

[2]) R. Adler, Die Hetero- und Protoalbumose des Fibrins. Inaug.-Diss., Leipzig 1907.

[3]) F. J. Birchard, Noch nicht veröffentlichte Untersuchungen aus diesem Institut.

[4]) E. Hitschmann, Zur Kenntnis der Trypsinfibrinpeptone. Inaug.-Diss., Leipzig 1907.

[5]) M. Siegfried, Berl. Ber. **39**, 297 (1906)

was nicht minder wichtig ist, Aminokörper auf ihre Einheitlichkeit hin zu untersuchen. Bei einem Gemisch von Aminosäuren werden dieselben bei einer Fraktionierung durch die Karbaminoreaktion sicherlich in wechselnder Menge in den einzelnen Fraktionen auftreten. Reine einheitliche Produkte hingegen zeigen nach ihrer Regenerierung aus den Fraktionen in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften Übereinstimmung sowohl unter sich, als auch mit der ursprünglichen Substanz.

a) I. fraktionierte Baryumkarbaminofällung.

Da, wie bereits oben erwähnt, von einer ganzen Reihe von Eiweißkörpern die Existenz eines Karbaminates erwiesen war, durfte ich erwarten, daß auch das Glutinpepsinpepton ein Karbaminat bilden würde:

10 g im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknetes Pepton (I. Darstellung) wurden in wenig Wasser gelöst und dieser Lösung 200 ccm kalt gesättigte Barytlösung[1]) hinzugesetzt. Unter guter Eiskühlung wurde Kohlensäure bis zur schwach alkalischen Reaktion eingeleitet. Die Alkalität wurde durch Tüpfeln auf Lakmus geprüft. Dann wurden nochmals 100 ccm gekühlte Barytlösung zugesetzt und von dem Niederschlag (A) rasch abgesaugt und derselbe mit gut in Eis gekühlter gesättigter Barytlösung nachgewaschen. Dieser Niederschlag (A) wurde bei 40° auf dem Wasserbade eine Zeit lang mit einem geringen Überschuß von Ammonkarbonat digeriert, abfiltriert und mit heißem Wasser bis zur Peptonfreiheit gewaschen.

Das Filtrat wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen und wie schon früher beschrieben (S. 16) das Pepton in Alkohol gefällt.

Das Filtrat des Niederschlages A (400 ccm) wurde mit fein gepulvertem Baryt gesättigt (30 g) und unter denselben Bedingungen wie vorher Kohlensäure bis zur schwach alkalischen Reaktion eingeleitet, nochmals 20 g Baryt eingetragen, wieder Kohlensäure bis zur schwachalkalischen Reaktion eingeleitet und zum Schluß 200 ccm gekühlte gesättigte Barytlösung hinzugegeben. Der ge-

[1]) Es kam nur ganz reiner aschefreier Baryt von Kahlbaum-Berlin zur Verwendung.

nutschte Niederschlag (B) wurde genau so behandelt, wie dies bei Niederschlag A angegeben.

Das Filtrat des zweiten Niederschlages (B) (600 ccm) wurde in derselben Weise der Karbaminofraktion unterworfen, wie dies bei den beiden ersten geschehen. Der Zusatz an Baryt betrug hierbei 30, 30 und 15 g.

Das letzte Filtrat, die Mutterlauge, wurde mit Kohlensäure gesättigt, mit einem kleinen Überschuß von Ammonkarbonat bei mäßiger Temperatur auf dem Wasserbade digeriert, abfiltriert, gut mit heißem Wasser gewaschen, und das Filtrat im Vakuum eingedampft und in Alkohol gefällt.

Die Ausbeute der einzelnen Fraktionen an Pepton betrug:

1. Fraktion	0,4 g	= 4 %
2. Fraktion	0,8 g	= 8 %
3. Fraktion	1,8 g	= 18 %
4. Fraktion	2,0 g	= 20 %
Gesamtausbeute	5,0 g	= 50 %.

Der Verlust ist wohl zum großen Teil auf die Alkoholfällung zurückzuführen. Die Peptone aller vier Fraktionen fielen beim Fällen in Alkohol sehr fein verteilt aus (vergl. S. 17). Da sie sich auch nach längerem Stehen nicht absetzten, auch einige Tropfen Essigsäure, die hinzugefügt wurden, das Absitzen nicht beschleunigten, so wurde so lange allmählich Äther I hinzugesetzt, bis sich das Pepton in ganz fein verteilten Flöckchen absetzte.

Die beiden ersten Fällungen mußten sogar im Vakuum auf ein geringes Volumen eingedampft werden, ehe sie zu filtrieren waren, und selbst jetzt ließ es sich auch bei sorgfältigster Filtration nicht vermeiden, daß ein Teil mit durchs Filter ging.

Bestimmung der optischen Drehung und des Metallgehaltes der Barytsalze.

I. Fraktion:

$c = 1{,}7520$
$\alpha = -1{,}14^0 \quad [\alpha_D]^{20} = -65{,}07^0.$
$t = 20^0$
$l = 1$ dcm

0,1301 g Ba-Salz gaben 0,0238 g $BaSO_4$
Ba = 10,76 %.

II. Fraktion:

$c = 1{,}8890$
$\alpha = -1{,}54^0 \quad [\alpha_D]^{20} = -81{,}53^0.$
$t = 20^0$
$l = 1$ dcm

0,1836 g Ba-Salz gaben 0,0314 g $BaSO_4$
Ba = 10,03 %.

III. Fraktion:

$c = 2{,}5310$
$\alpha = -2{,}08^0 \quad [\alpha_D]^{20} = -82{,}18^0.$
$t = 20^0$
$l = 1$ dcm

0,1342 g Ba-Salz gaben 0,0224 g $BaSO_4$
Ba = 9,82 %.

IV. Fraktion:

$c = 1{,}6470$
$\alpha = -1{,}35^0 \quad [\alpha_D]^{20} = -81{,}96^0.$
$t = 20^0$
$l = 1$ dcm

0,1356 g Ba-Salz gaben 0,0234 g $BaSO_4$
Ba = 10,15 %.

Darstellung	Optische Drehung des Peptons	% Ba der Barytsalze
I. Fraktion	$-65{,}07^0$	10,76 %
II. Fraktion	$-81{,}53^0$	10,05 %
III. Fraktion	$-82{,}18^0$	9,82 %
IV. Fraktion	$-81{,}96^0$	10,15 %
I. Darstellung	$-81{,}79^0$	10,05 %

b) II. fraktionierte Baryumkarbaminofällung.

Da nach den Versuchen der I. fraktionierten Baryumkarbaminofällung die Existenz eines Karbaminosalzes des Pepsinglutinpeptons erwiesen ist, jedoch die zum Teil geringen Ausbeuten keine eingehenderen Untersuchungen des aus den Fraktionen

regenerierten Peptons gestatteten, so wiederholte ich die Fraktionierung. Diesmal wurde jedoch eine wesentlich größere Menge Pepton in Angriff genommen und die Fraktionierung auf sechs Fraktionen ausgedehnt.

Um eine bessere und vor allen Dingen gleichmäßigere Ausbeute an Pepton zu erzielen, wurde gleich von Anfang an eine größere Barytmenge zugesetzt. Ferner wurde besonders darauf Bedacht genommen, jeglichen Verlust möglichst zu vermeiden. So wurde, um eine eventuelle Zersetzung des Karbaminates in der Wärme zu vermeiden, der Barytniederschlag auf einem, mit reinem Kristalleis ständig gekühlten Trichter abgesaugt. Der mit Ammonkarbonat zersetzte Niederschlag wurde nicht nur auf der Nutsche gut mit heißem Wasser gewaschen, sondern auch noch zweimal in der Reibschale mit heißem Wasser verrieben und wieder abgenutscht.

Bei Anwendung all dieser Vorsichtsmaßregeln gelang es mir denn auch gleichmäßig gute Ausbeuten bei allen Fraktionen zu erzielen.

Die Ausführung der Fraktionierung war wieder folgende:

30 g im evakuierten Exsikkator längere Zeit getrocknetes Pepton (II. Darstellung) wurden in 600 ccm kalt gesättigter Barytlösung gelöst. Es wurde gut in Eis gekühlt und Kohlensäure bis zur schwach alkalischen Reaktion eingeleitet; 15 g Baryt hinzugegeben, abermals Kohlensäure eingeleitet, wieder 15 g Baryt zugesetzt und Kohlensäure eingeleitet und nach weiterem Zusatz von 30 g Baryt abgesaugt. Der Barytniederschlag wurde dann in der vorher beschriebenen Weise weiter behandelt.

Das jedesmalige Filtrat des Barytniederschlages wurde wieder der Karbaminierung unterworfen.

Der Zusatz an Baryt betrug:

bei Fraktion	II	20 g	20 g	und	40 g
„ „	III	25 g	25 g	„	50 g
„ „	IV	30 g	30 g	„	60 g
„ „	V	35 g	35 g	„	70 g

Fraktion VI bildete das letzte Filtrat, das mit Kohlensäure gesättigt und mit Ammonkarbonat in geringem Überschuß in der Wärme digeriert wurde.

Die Filtrate und Waschwässer der Ammonkarbonatniederschläge wurden im Vakuum eingedampft, die Rückstände mit Wasser aufgenommen und in Alkohol gefällt.

Die Ausbeuten an Pepton betrugen:

bei der	I. Fraktion	4 g = $13^1/_3$ %
„ „	II. „	3,5 g = $11^2/_3$ %
„ „	III. „	6,5 g = $21^2/_3$ %
„ „	IV. „	3 g = 10 %
„ „	V. „	3,5 g = $11^2/_3$ %
„ „	VI. „	3,5 g = $11^2/_3$ %
Gesamtausbeute		24,0 g = 80 %
Verlust		6,0 g = 20 %.

Zur Identifizierung mit dem zur Fraktionierung verwendeten Pepton (Pepton der II. Darstellung) wurde von allen Fraktionen die optische Drehung, der Stickstoffgehalt und der Baryumgehalt des Barytsalzes, von vier Fraktionen auch der Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt bestimmt.

Die zur Untersuchung dienende Substanz wurde bei 75° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Fraktion I.

c = 1,1350
t = 20°
l = 2 dcm $[\alpha_D]^{20} = -66{,}07°$.
$\alpha = -1{,}50°$
$(\pm 0{,}02)$

c = 1,4180
t = 20°
l = 2 dcm $[\alpha_D]^{20} = -65{,}23°$.
$\alpha = -1{,}85°$
$(\pm 0{,}02)$

Die Drehung war auch nach 24 Stunden noch konstant.

0,2430 g Substanz verbrauchten 26,6 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.

N = 17,05 %.

0,2080 g Pepton gaben 0,3640 g CO_2 und 0,1234 g H_2O.

C = 47,75 %; H = 6,64 %.

Fraktion II.

c = 1,6490
t = 20°
l = 2 dcm $[\alpha_D]^{20} = -81{,}56°$.
$\alpha = -2{,}69$
$(\pm 0{,}03)$

0,2965 g Substanz verbrauchten 36 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
N = 17,00 %.

Fraktion III.

c = 1,0640
t = 20°
l = 2 dcm $[\alpha_D]^{20} = -80{,}83°$.
$\alpha = 1{,}72$
$(\pm 0{,}01)$

0,1818 g Substanz verbrauchten 23,3 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
N = 17,17 %.

0,1686 g Substanz gaben 0,2944 g CO_2 und 0,0986 g H_2O.
C = 47,62 %; H = 6,54 %.

Fraktion IV.

c = 0,8900
t = 20°
l = 2 dcm $[\alpha_D]^{20} = -81{,}46°$
$\alpha = -1{,}45°$

0,1618 g Substanz verbrauchten 19,8 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
N = 17,13 %.

0,1788 g Substanz gaben 0,3154 g CO_2 und 0,1074 g H_2O.
C = 48,11 %; H = 6,72 %.

Fraktion V.

c = 1,2970
t = 20°
l = 2 dcm $[\alpha_D]^{20} = -80{,}18°$.
$\alpha = -2{,}08$
$(\pm 0{,}02)$

0,2944 g Substanz verbrauchten 36,1 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
N = 17,15 %.

Fraktion VI.

$c = 1{,}1090$
$t = 20^0$
$l = 2$ dcm $\quad [\alpha_D]^{20} = -81{,}15^0$.
$\alpha = -1{,}80^0$
$(\pm 0{,}01)$

0,2172 g Substanz verbrauchten 26,7 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
$N = 17{,}21\ ^0/_0$.

0,1996 g Substanz gaben 0,3478 g CO_2 und 0,1220 g H_2O.
$C = 48{,}06\ ^0/_0$; $H = 6{,}84\ ^0/_0$.

Zusammenstellung der Resultate der II. Baryumkarbaminofällung.

Darstellung	$[\alpha_D]^{20}$	% N.	% C.	% H.
	$-66{,}07^0$			
I. Fraktion	$-65{,}23^0$	17,05	47,75	6,64
II. Fraktion	$-81{,}56^0$	17,00	—	—
III. Fraktion	$-80{,}83^0$	17,17	47,62	6,54
IV. Fraktion	$-81{,}46^0$	17,13	48,11	6,72
V. Fraktion	$-80{,}18^0$	17,15	—	—
VI. Fraktion	$-81{,}15^0$	17,21	48,06	6,84
III. Darstellung	$-81{,}3^0$	17,25	47,67	6,75
(ursprüngl. Pepton)		17,04		

Barytsalz der Fraktionen.

I. Fraktion.

0,2300 g Ba-Salz gaben 0,0406 g $BaSO_4$.
$Ba = 10{,}39\ ^0/_0$.

II. Fraktion.

0,2714 g Ba-Salz gaben 0,0462 g $BaSO_4$.
$Ba = 10{,}02\ ^0/_0$.

III. Fraktion.

0,1882 g Ba-Salz gaben 0,0319 g $BaSO_4$.
$Ba = 9{,}98\ ^0/_0$.

IV. Fraktion.

0,1385 g Ba-Salz gaben 0,0237 g $BaSO_4$.
Ba = 10,07 %.

V. Fraktion.

0,1960 g Ba-Salz gaben 0,0336 g $BaSO_4$.
Ba = 10,09 %.

VI. Fraktion.

0,2121 g Ba-Salz gaben 0,0362 g $BaSO_4$.
Ba = 10,04 %.

Zusammenstellung der Resultate.

Darstellung	I. Fraktion	II. Fraktion	III. Fraktion	IV. Fraktion	V. Fraktion	VI. Fraktion	II. Darstellg. urspr. Subst.
% Ba	10,39	10,02	9,98	10,07	10,09	10,04	10,13 9,8

Ein Vergleich der Werte der ursprünglichen Substanz mit denen der einzelnen Fraktionen zeigt deutlich Übereinstimmung aller Konstanten.

Zwar weist die optische Drehung der jedesmaligen ersten Fraktion einen niedrigeren Drehungswinkel auf, als wie es bei allen übrigen der Fall ist, doch glaube ich dies dadurch erklären zu können, daß ganz minimale Spuren von irgend welcher Beimengung, die sich möglicherweise in der ganzen Peptonmenge findet, durch die Fraktionierung sämtlich in der ersten Fraktion zurückgehalten werden und sich dann hier bei der großen Empfindlichkeit der Polarisation[1]) bei dieser bemerkbar machen. Wie gering diese Beimengung immerhin sein muß, geht daraus hervor, daß sie auf die anderen Werte vollkommen ohne Einfluß ist.

[1]) So setzen z. B. die geringsten Spuren von Ammonsulfat die Drehung bedeutend herab.

c) Fraktionierte Baryumkarbaminofällung eines Peptongemisches.

Nachdem die Fraktionierung einer einheitlichen Substanz solche übereinstimmende Werte gezeigt hatte, erschien es wünschenswert zu sehen, wie sich wohl ein Peptongemisch der Fraktionierung gegenüber verhalten würde.

Zu diesem Zwecke wurde in einer, aus dem Alkoholfiltrat einer Peptondarstellung durch abermaliges Eindampfen im Vakuum gewonnenen konzentrierten Lösung von Pepsinglutinpepton, 5 g eines Pepsin-Fibrin-Peptons, das mir von Herrn Prof. Siegfried zur Verfügung gestellt wurde, gelöst.

Durch Fällen in Alkohol wurde das Pepton gewonnen.

Ausbeute: 10 g.

Von diesem Pepton wurde die Polarisation bestimmt.

$c = 0{,}1204$
$t = 20^0$
$l = 2$ dcm
$\alpha = -1{,}65^0$
$(\pm 0{,}02)$

$[\alpha_D]^{20} = -68{,}52^0$.

8 g dieser Substanz wurden nun der fraktionierten Baryumkarbaminofällung unterworfen, die genau in derselben Weise ausgeführt wurde, wie dies bei der vorigen Fraktionierung beschrieben.

Gewonnen wurden drei Fraktionen, deren Ausbeute bei:

Fraktion I 1,2 g = 15%
„ II 2,0 g = 25%
„ III 2,8 g = 35%
6,0 g = 75% betrugen.

Die Polarisation der einzelnen Fraktionen ergab folgende Werte:

Fraktion I.

$c = 0{,}09585$
$t = 20^0$
$l = 2$ dcm
$\alpha = -1{,}09^0$

$[\alpha_D]^{20} = -56{,}86^0$.

Diese Drehung war auch nach 48 Stunden noch konstant.

Fraktion II.

$c = 0{,}0980$
$t = 20^0$
$l = 2$ dcm $\qquad [\alpha_D]^{20} = -62{,}76^0.$
$\alpha = -1{,}23^0$
$(\pm 0{,}01)$

Fraktion III.

$c = 0{,}0761.$
$t = 20^0.$
$l = 2$ dcm $\qquad [\alpha_D]^{20} = -78{,}83^0.$
$\alpha = -1{,}20^0$
$(\pm 0{,}01)$

Pepton der	$[\alpha_D]^{20}$
I. Fraktion	$-56{,}86^0$
II. Fraktion	$-62{,}78^0$
III. Fraktion	$-78{,}83^0$
des ursprüngl. Peptongemisches	$-68{,}52^0$

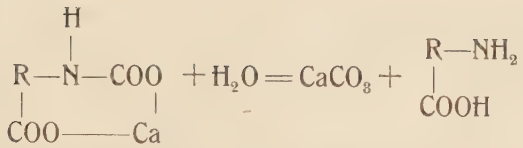
Der große Unterschied der Resultate in den einzelnen Fraktionen zeigt deutlich, daß bei der Fraktionierung einer nicht einheitlichen Substanz auch übereinstimmende Werte nicht erhalten werden.

Hieraus kann man aber wiederum den Schuß ziehen, daß, wenn bei der fraktionierten Fällung einer Substanz übereinstimmende Werte der Konstanten erhalten werden, man es mit einem einheitlichen Körper zu tun hat.

Übereinstimmung der Konstanten zeigte sich bei meinem Pepsinglutinpepton, ein Beweis also, daß eine einheitliche Substanz vorliegt.

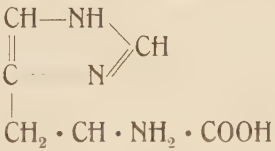
d) Bestimmung des Quotienten CO_2 : N.

Wird die abfiltrierte klare Lösung des Karbaminates erhitzt, so findet wieder eine Spaltung desselben unter Abscheidung von Calciumkarbonat und Rekonstitution des Aminokörpers statt:



Durch Bestimmung des Calciumkarbonats und des im Filtrat sich befindenden Stickstoffs läßt sich erkennen, wieviel des betreffenden Aminokörpers in das Salz seiner Karbonsäure übergeführt ist. Dividiert man den Wert für Calciumkarbonat durch das Molekulargewicht desselben und den Wert für Stickstoff durch dessen Atomgewicht, so erhält man z. B. beim Glykokoll ein Atomverhältnis $CO_2 : N = 1 : 1$, d. h. die Amidgruppe des Glykokolls hat quantitativ ein Molekül Kohlensäure gebunden.

Reagieren bei den Körpern mit mehreren N-Atomen die N-haltigen Gruppen quantitativ, so läßt sich aus der gebundenen Kohlensäure feststellen, wieviel N-Atome der Verbindung die Karbaminoreaktion geben. Findet man z. B. beim Histidin



das Verhältnis $CO_2 : N = 1 : 3$,[1]) so besagt dies, daß von den 3 N-Atomen nur ein N-Atom, und zwar die Amid-, nicht die Imidgruppe reagiert.

Analog den Amidosäuren ist auch bei den Eiweißkörpern das Verhältnis $CO_2 : N$ ein konstantes, das charakteristisch ist für die jedesmalige Art desselben.

So fanden M. Siegfried und H. Liebermann[2])

für Trypsinfibrinpepton α: $CO_2 : N = 1 : 2{,}22$
$1 : 2{,}26$
$1 : 2{,}46$

für Trypsinfibrinpepton β: $CO_2 : N = 1 : 2{,}14$
$1 : 2{,}16$

M. Siegfried und O. Pilz[3]) für Glutokyrin $1 : 2{,}29$.

---

[1]) M. Siegfried u. C. Neumann, Ztschr. f. physiol. Chem. **54**, 423 (1908).
[2]) M. Siegfried u. H. Liebermann, ebenda, **54**, 437 (1908).
[3]) M. Siegfried u. O. Pilz, ebenda, **58**, 215 (1909).

Die Ausführung der Methode zur Bestimmung des Quotienten ist nach den Vorschriften Siegfrieds[1]) folgende:

Die zu prüfende Substanz wird in ca. 50 ccm Wasser gelöst. Zu der in Eiswasser abgekühlten Lösung gibt man einige Tropfen einer frischbereiteten Lösung von Phenolphtalein in Kalkwasser (Lösung in Alkohol darf nicht verwendet werden)[2]) und ca. 10 ccm ebenfalls abgekühlte Kalkmilch (200 g Ätzkalk aus Marmor in 1 l Wasser). Man leitet unter stetigem Umschwenken Kohlensäure ein, bis die rote Farbe des Indikators fast verschwunden ist, gibt ca. 10 ccm Kalkmilch hinzu, leitet wieder wie vorher Kohlensäure bis zum Verblassen der roten Farbe ein, gibt wieder ca. 10 ccm Kalkmilch hinzu, leitet wieder Kohlensäure wie vorher ein und schüttelt nach weiterem Zusatz von ca. 20 ccm Kalkmilch kräftig durch. Während des ganzen Versuches wird gut in Eiswasser gekühlt; als Reaktionsgefäß verwendet man am vorteilhaftesten ein Pulverglas mit eingeschliffenem Stopfen. Hierauf wird auf einer kleinen Nutsche abgesaugt, das Filtrat, welches völlig klar sein muß, in einen ca. 500 ccm fassenden Erlenmeyer überführt und mit ca. 150 ccm ausgekochten Wassers vermischt. Der Erlenmeyer wird sogleich mit einem Gummistopfen verschlossen, durch dessen Bohrung ein nach abwärts gebogenes Natronkalkrohr geführt ist. Der Kolben wird zum Sieden erhitzt. Nach Erkalten des Inhalts wird auf gewogenem Gooch-Tiegel abgesaugt; hierbei der Kolben sorgfältigst mit einem Gummiwischer von etwa anhaftendem Calciumkarbonat befreit. Nach Auswaschen mit kaltem Wasser wird der Tiegel bei etwa 120° getrocknet; die Gewichtszunahme desselben gibt das gesuchte Gewicht Calciumkarbonat an.

Das Filtrat vom Calciumkarbonat wird nach Zusatz von 20 ccm Schwefelsäure in einem 500 ccm fassenden Kjeldahlkolben eingedampft und schließlich unter Zusatz von Kaliumpermanganat fertig kjeldahlisiert. Man erhält so die gesuchten ccm $^n/_{10}$ Säure.

Auch hier bei diesen Versuchen war es nötig, jede zur Verwendung kommende Peptonmenge im Trockenapparat bis zum konstanten Gewicht zu trocknen. Ein nicht getrocknetes Pepton würde unrichtige Resultate liefern, da es ja zum Teil noch Ammon-

[1]) M. Siegfried u. C. Neumann, Ztschr. f. physiol. Chem. **52**, 506 (1907).
[2]) M. Siegfried, ebenda, **54**, 423 (1908).

salze sind, die sich erst beim Trocknen in Pepton und Ammoniak zerlegen.

Bei den ersten Versuchen, bei denen ca. 0,25 g Pepton angewandt wurden, erhielt ich beim Erhitzen der filtrierten klaren Lösung nur eine verhältnismäßig sehr geringe Menge abgespaltenen Calciumkarbonates. Jedoch lag dies daran, daß ich mich mit der Ausführung der Methode noch nicht ganz vertraut gemacht hatte. Weitere Versuche ergaben genügende Abscheidung von Calciumkarbonat und gut übereinstimmende Werte.

Pepsinglutinpepton der I. Darstellung.

Angewandte Substanz 0,2494 g.

$CaCO_3 = 0{,}021$ g. $^n/_{10}\ H_2SO_4 = 14{,}7$ ccm.

$CO_2 : N = 1 : 7{,}00.$

Angewandte Substanz 0,9399 g.

$CaCO_3 = 0{,}1056$ g. $^n/_{10}\ H_2SO_4 = 74{,}1$ ccm.

$CO_2 : N = 1 : 7{,}02.$

Angewandte Substanz 1,0514 g.

$CaCO_3 = 0{,}1328$ g. $^n/_{10}\ H_2SO_4 = 92{,}8$ ccm.

$CO_2 : N = 1 : 6{,}99.$

Darstellung II.

Angewandte Substanz 0,3396 g.

$CaCO_3 = 0{,}0330$ g. $^n/_{10}\ H_2SO_4 = 23{,}1$ ccm.

$CO_2 : N = 1 : 7{,}00.$

Angewandte Substanz 0,4446 g.

$CaCO_3 = 0{,}0468$ g. $^n/_{10}\ H_2SO_4 = 33{,}0$ ccm.

$CO_2 : N = 1 : 7{,}05.$

Darstellung III.

Angewandte Substanz 0,7362 g.

$CaCO_3 = 0{,}0640$ g. $^n/_{10}\ H_2SO_4 = 45{,}4$ ccm.

$CO_2 : N = 1 : 7{,}09.$

Darstellung IV.

Angewandte Substanz 0,3452 g.

$CaCO_3 = 0{,}0384$ g. $^n/_{10}\ H_2SO_4 = 26{,}85$ ccm.

$CO_2 : N = 1 : 6{,}99.$

Zusammenstellung der Resultate.

Darstellung	Angewandte Substanz g	$CaCO_3$ g	$^n/_{10}$ H_2SO_4 ccm	$CO_2 : N$
I.	0,2494	0,0210	14,7	1 : 7,00
	0,9399	0,1056	74,1	1 : 7,02
	1,0514	0,1328	92,8	1 : 6,99
II.	0,3396	0,0330	23,1	1 : 7,00
	0,4446	0,0468	33,0	1 : 7,05
III.	0,7362	0,0640	45,4	1 : 7,09
IV.	0,3452	0,0384	26,85	1 : 6,99
			Im Mittel:	1 : 7,02

Als Konstante des Quotienten $CO_2 : N$ ergibt sich also für das Pepsinglutinpepton $CO_2 : N = 1 : 7$.

Bei der Bestimmung des Quotienten bei dem aus den Fraktionen regenerierten Pepton ergab sich zunächst ein kleiner Unterschied der Werte gegenüber dem nicht der fraktionierten Fällung unterworfenen Pepton. Nach einmaligem Umfällen aus Alkohol (das ursprüngliche Pepton war auch einmal umgefällt) zeigten jedoch die für den Quotienten erhaltenen Zahlen schon annehmbare Übereinstimmung.

III. Fraktion (einmal umgefällt).

1. Angewandte Substanz 0,5464 g.
   $CaCO_3 = 0{,}0448$ g $\quad$ $^n/_{10}$ $H_2SO_4 = 29{,}8$ ccm.
   $CO_2 : N = 1 : 6{,}65$.
2. Angewandte Substanz 0,1686 g.
   $CaCO_3 = 0{,}0226$ g $\quad$ $^n/_{10}$ $H_2SO_4 = 15{,}5$ ccm.
   $CO_2 : N = 1 : 6{,}80$.

Dasselbe wie durchs Umfällen erreichte ich auch, wenn das Pepton, in einer größeren Alkoholmenge suspendiert, des öfteren heftig umgeschüttelt und nach mehrtägigem Stehen wieder abgenutscht, mit Alkohol gewaschen und wieder getrocknet wurde.

Das so behandelte Pepton der vierten Fraktion ergab folgende Werte:

IV. Fraktion.

1. Angewandte Substanz 0,2570 g.
   $CaCO_3 = 0{,}0284$ g $\quad {}^n/_{10}\ H_2SO_4 = 19{,}6$ ccm.
   $CO_2 : N = 1 : 6{,}90$.
2. Angewandte Substanz 0,3466 g.
   $CaCO_3 = 0{,}0350$ g $\quad {}^n/_{10}\ H_2SO_4 = 24{,}1$ ccm.
   $CO_2 : N = 1 : 6{,}88$.

Zusammenstellung der Resultate.

Fraktion	Angewandte Substanz g	$CaCO_3$ g	${}^n/_{10}\ H_2SO_4$ ccm	$CO_2 : N$
III.	0,5464	0,0448	29,8	1 : 6,65
	0,1686	0,0226	15,5	1 : 6,80
IV.	0,2570	0,0284	19,6	1 : 6,90
	0,3466	0,0350	24,1	1 : 6,88

2. CO_2 : N-Verhältnis der Spaltungsprodukte des Pepsinglutinpeptons.

Nach Feststellung des CO_2 : N-Verhältnisses des Pepsinglutinpeptons erschien es mir von Interesse, auch den Quotienten der Spaltungsprodukte dieses Peptons zu bestimmen.

Denn, da für eine Anzahl von Aminosäuren das CO_2 : N-Verhältnis schon bekannt ist,[1]) so wird hier die Kenntnis des Quotienten der Spaltungsprodukte ein wichtiger Hinweis auf die Art der Spaltungsprodukte selber sein.

1 g Pepsinglutinpepton wurde in 25 ccm Wasser gelöst und mit 12 g konzentrierter Schwefelsäure 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die Spaltungslösung wurde in ein größeres Becherglas gespült und zur Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt in geringem Überschuß, und zur Entfernung des Baryt mit Ammonkarbonat versetzt. Das klare Filtrat wurde auf dem Wasserbad vollkommen bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und auf 100 ccm aufgefüllt.

20 ccm dieser Lösung wurden der Karbaminoreaktion unterworfen.

Angewandte Substanz 20,0 ccm.
$CaCO_3 = 0{,}1025$ g $\quad {}^n/_{10}\ H_2SO_4 = 10{,}6$ ccm.
$CO_2 : N = 1 : 1{,}03$.

[1]) M. Siegfried u. C. Neumann, Ztschr. f. physiol. Chem. **54**, 423 (1908).

Um zu sehen ob ein einmaliges Eindampfen genügt hatte, um alles Ammoniak zu vertreiben (Ammoniak würde den Quotienten vergrößern), wurden 30 ccm der Spaltungslösung nochmals gut zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und der Quotient bestimmt.

Angewandte Substanz 30,0 ccm.

$CaCO_3 = 0{,}1688$ g $\quad {}^{n}/_{10}\, H_2SO_4 = 18{,}2$ ccm.

$CO_2 : N = 1 : 1{,}08.$

Ein einmaliges Eindampfen hatte also schon genügt, um das Ammoniak zu entfernen.

Vorher war bereits gesagt, daß die Kenntnis des Quotienten der Spaltungsprodukte ein wichtiger Hinweis auf die Art der Spaltungsprodukte selber sei.

Das für die Spaltungsprodukte ermittelte CO_2 : N-Verhältnis war nahezu 1 : 1. Daraus geht hervor, daß als Spaltungsprodukte in der Hauptsache nur die Amidosäuren in Frage kommen, deren Quotient 1 : 1 ist, und die sich als Spaltungsprodukte schon im Glutin selber finden. Hierhin gehören in erster Linie Glykokoll, Glutaminsäure und Lysin, vielleicht auch noch Leucin, für die C. Neumann[1]) folgende Werte erhielt:

Glykokoll	$CO_2 : N = 1 : 1$	$CO_2 : N = 1 : 1{,}03$
Glutaminsäure	$CO_2 : N = 1 : 0{,}99$	$CO_2 : N = 1 : 1$
Lysin	$CO_2 : N = 1 : 0{,}99$	$CO_2 : N = 1 : 1{,}01$
Leucin	$CO_2 : N = 1 : 0{,}94$	$CO_2 : N = 1 : 0{,}97.$

Daneben finden sich dann geringe Mengen einer Amidosäure, deren Quotient kleiner sein muß. Als solche käme Arginin in Betracht, dessen CO_2 : N-Verhältnis 1 : 4 und 1 : 3,93 gefunden ist.

C. Einige Derivate des Pepsinglutinpeptons.

Zur Erkennung, Isolierung, Reinigung und Trennung von Amidosäuren ist die Darstellung verschiedener Derivate aus Amidosäuren empfohlen worden.

Zuerst bekannt waren wohl die Benzoylverbindungen der Aminosäuren, an deren Spitze die Hippursäure steht. Sie entsteht durch Schütteln von Benzoylchlorid mit einer alkalischen

[1]) M. Siegfried u. C. Neumann, Ztschr. f. physiol. Chem. **54**, 423 (1908).

Lösung von Glykokoll. Bei den höher molekularen Amidosäuren gibt diese Methode jedoch schlechte Resultate und versagt zum Teil ganz. Durch Anwendung von Natriumkarbonat an Stelle von Natronlauge hat E. Fischer[1]) nicht nur für einfache Amidosäuren, sondern auch für Asparagin- und Glutaminsäure schöne Derivate erhalten.

Leichter als die Benzoylderivate entstehen die Formylverbindungen,[2]) die beim Kochen der Aminosäuren mit trockener Ameisensäure gewonnen werden. Für die aromatischen Aminosäuren war die leichte Bildung des Formylderivates schon länger bekannt.[3])

Wenig Bedeutung haben die Acetylverbindungen, von denen zuerst die von Kraut und Hartmann beschriebene Acetursäure dargestellt wurde.

Paal[4]) machte dann die Beobachtung, daß sich Aminosäuren in alkalischer Lösung auch mit Phenylisocyanat zu den sogenannten Phenylureïdosäuren verbinden, die zum Teil sehr schöne kristallinische Produkte sind.

Einfacher als die bisher beschriebenen Derivate lassen sich die Verbindungen der Aminosäuren mit der Benzolsulfosäure darstellen: man schüttelt das Chlorid derselben mit der alkalischen Lösung der Amidosäuren.[5]) Das sich hierbei bildende Benzolsulfoderivat läßt sich von der gleichzeitig mitgebildeten in Wasser leicht löslichen Sulfozsäure gut trennen.

Mit Vorteil ersetzte E. Fischer[6]) das Benzolsulfochlorid durch das β-Naphtalinsulfochlorid. Diese Methode beschränkt sich nicht nur auf die einfachen Aminosäuren, sondern gibt auch sowohl bei Oxyaminosäuren, z. B. Serin und Oxyprolin, als auch bei den Polypeptiden, z. B. Glycylglycin und Alanylglycin, gute Resultate.

An Stelle des Naphtalinsulfochlorids hat M. Siegfried[7]) das 4-Nitrotoluol-2-sulfochlorid empfohlen. Da ihre Derivate

---

[1]) E. Fischer, Berl. Ber. **32**, 2453 (1899).

[2]) E. Fischer u. O. Warburg, Berl. Ber. **38**, 3997 (1905).

[3]) Zehra, Berl. Ber. **23**, 3633 (1890).

[4]) Paal, Berl. Ber. **27**, 974 (1894).

[5]) Ihrfeld, Berl. Ber. **22**, 692 (1890); Hedin, ebenda **22**, 3197 (1890); E. Fischer, ebenda **33**, 2380 (1900); **34**, 448 (1901).

[6]) E. Fischer u. P. Bergell, Berl. Ber. **35**, 3779 (1902).

[7]) M. Siegfried, Ztschr. f. physiol. Chem. **43**, 68 (1904).

schwer löslich in Wasser sind, gute Schmelzpunkte besitzen und glatt entstehen, ist auch sie zur Isolierung von Amidosäuren gut geeignet.

Da die Peptone ihrer Natur nach Aminosäuren sind, so durfte ich erwarten, daß sie diese Aminosäurenatur den oben angegebenen Säuren gegenüber in der Weise dokumentieren würden, daß sie mit denselben wohlcharakterisierte Derivate liefern. Auch nahm ich an, daß die Darstellung einiger Derivate es mir zugleich erlauben würde, wiederum darüber Aufschluß zu erhalten, ob das von mir dargestellte Pepton ein einheitlicher Körper ist oder nicht, was ja aus dem Ergebnis der Analysenwerte leicht ersichtlich sein würde. Auch sollte das Verhalten dieser Peptonderivate bei einer Spaltung studiert werden. Möglich war ja, daß hierbei das Pepton als solches gespalten würde, und die dabei entstandenen Aminosäuren sich wieder mit dem Naphtalinsulfokomplex zu neuen Derivaten vereinigen würden; möglich war aber auch, daß gar keine, oder aber schließlich, daß eine vollkommene Zersetzung von Pepton und Sulfosäure eintreten würde.

Da bei den komplizierten Aminosäuren sich die β-Naphtalin- und die 4-Nitrotoluol-2-sulfosäure am besten zur Darstellung der Derivate eignen, sollten auch mir diese beiden Sulfosäuren zur Darstellung der Peptonverbindungen dienen.

Die Darstellung der Nitrotoluolsulfoderivate geschieht in ganz ähnlicher Weise wie die der β-Naphtalinsulfoderivate, für die Fischer[1]) folgende Angaben macht:

Zwei Mol.-Gew. β-Naphtalinsulfochlorid werden in Äther gelöst, dazu fügt man die Lösung der Aminosäure in der für ein Molekül berechneten Menge Normalnatronlauge und schüttelt mit Hilfe einer Maschine kräftig bei gewöhnlicher Temperatur. In Intervallen von ein bis anderthalb Stunden fügt man dann noch dreimal die gleiche Menge Normalalkali hinzu. Der Überschuß des Chlorids ist erfahrungsgemäß für die Ausbeute vorteilhaft. Da es nicht vollständig verbraucht wird, so ist zum Schluß die wässrige Lösung noch alkalisch. Sie wird von der ätherischen Schicht getrennt, filtriert und mit Salzsäure übersättigt. Dabei fällt die schwer lösliche Sulfoverbindung aus.

[1]) E. Fischer u. P. Bergell, Berl. Ber. **35**, 3779 (1902).

Bei der Darstellung der Peptonderivate hielt ich mich bei den ersten Versuchen genau an diese Vorschriften, die dann aber einige Modifikationen erfahren mußten.

Da die Analyse für die Peptonderivate einen doppelten Sulfosäurekomplex auf das Äquivalentgewicht des Peptons berechnet ergab, so mußten hier zur Erzielung einer guten Ausbeute 4 Mol.-Gew. des Sulfochlorids und die für zwei Moleküle berechnete Menge Normalnatronlauge in Anwendung gebracht werden. Wurde die alkalische Lösung des Peptonderivates mit Salzsäure übersättigt, so fiel die Verbindung als schmierige harzige Masse aus, die sich äußerst schwer filtrieren und trocknen ließ. Ich änderte daher das Fällen in der Weise ab, daß ich die alkalische Lösung in eine ganz verdünnte Salzsäure eingoß, deren Konzentration so gewählt war, daß nach dem Eingießen die Flüssigkeit nur noch schwach salzsauer war. Auf diese Weise erreichte ich es, daß sich die Derivate in Flocken abschieden, die sich nach dem Absitzen gut filtrieren, waschen und trocknen ließen.

a) *β*-Naphtalinsulfopepsinglutinpepton.

$(C_{10}H_7 \cdot SO_2)_2 \cdot C_{23}H_{37}N_7O_{10}$.

Das Produkt fällt als weiß-gelbliche flockige Masse beim Eingießen der alkalischen Lösung in verdünnte Salzsäure. Die Ausbeute beträgt 70% der Theorie. Es löst sich in viel heißem Wasser, Alkohol, Eisessig, Aceton usw., scheidet sich jedoch aus all diesen Lösungen beim Erkalten schmierig ab. Kristallisiert war es nicht zu erhalten.

Schmelzpunkt: 205—210° unkorr.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuumexsikkator bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

I. 0,2476 g Substanz (I. Darstellung)[1]) gaben 0,1228 g $BaSO_4$.
$S = 6{,}81\%$.

II. 0,2152 g Substanz (Darstellung II) gaben 0,1092 g $BaSO_4$.
$S = 6{,}97\%$.

III. 0,2526 g Substanz (Fraktion V) gaben 0,1238 g $BaSO_4$.
$S = 6{,}73\%$.

[1]) Die eingeklammerte Bemerkung gibt an, welches Pepton zur jedesmaligen Darstellung des Derivates benutzt wurde.

Gefunden I. S = 6,81 %, II. S = 6,97 %, III. S = 6,73 %
Berechnet für $(C_{10}H_7 \cdot SO_2)_2 \cdot C_{23}H_{36}N_7O_{10}$. S = 6,72 %,

b) 4-Nitrotoluol-2-sulfosäurepepsinglutinpepton.

$(C_6H_3 \cdot NO_2 \cdot CH_3 \cdot SO_2)_2 \cdot C_{23}H_{37}N_7O_{10}$.

Das Produkt fällt beim Eingießen der alkalischen Lösung in verdünnte Salzsäure in rötlich-gelben Flocken aus. Sein Verhalten entspricht dem der β-Naphtalinsulfoverbindung. Es ist in siedendem Alkohol, Eisessig, Aceton löslich, scheidet sich aber auch beim Erkalten aus diesen Lösungen als schmierige Masse aus. Es ist kristallisiert nicht zu erhalten. Schmelzpunkt: 165—170° unkorr.

I. 0,3688 g Substanz (Darst. I) gaben 0,1714 g $BaSO_4$
Gef. S = 6,38 %. Ber. S = 6,58 %.

II. 0,2452 g Substanz (Fraktion III) gaben 0,1174 g $BaSO_4$
Gef. S = 6,57 %. Ber. S = 6,58 %.

c) Spaltungsversuche von β-Naphtalinsulfo- und Nitrotoluolsulfopepsinglutinpepton.

E. Fischer[1]) hatte nachgewiesen, daß beim zweistündigen Erhitzen von β-Naphtalinsulfoglycyl-d-Alanin mit 10 %iger Salzsäure diese Verbindung in der Weise gespalten wird, daß sich beim Erkalten der Lösung, besonders aber beim Abstumpfen der überschüssigen Salzsäure mit Alkali, reines β-Naphtalinsulfoglycin abscheidet. Hieraus ist zu schließen, daß auch im Ausgangsmaterial die Glykokollgruppe auf Naphtalinsulfochlorid reagiert hatte, daß also die NH_2-Gruppe des Glykokolls frei war.

In ähnlicher Weise sollte nun auch hier eine Spaltung der Peptonderivate versucht werden.

Es wurden folgende Versuche angestellt:

I. 0,5 g β-Naphtalinsulfopepton wurden mit 20 ccm 10 %iger Salzsäure am Rückflußkühler gekocht. Die Substanz ballte sich hierbei zu einer schmierigen Masse zusammen, die von der Salzsäure überhaupt nicht angegriffen werden konnte. Da auch heftiges Stoßen des Kolbens eintrat, so brach ich den Versuch

[1]) E. Fischer; Sitzungsber. der preuß. Akad. d. Wissensch. 1907, S. 574.

nach einer Stunde ab. Von den Schmieren wurde filtriert und das Filtrat eingeengt. Der Rückstand war eine dunkle Schmiere, die sich nicht weiter verarbeiten ließ.

Auf die ungelöste Substanz konnte ich also die Salzsäure nicht einwirken lassen. Da sich Eisessig als bestes Lösungsmittel für die Derivate erwiesen hatte, so wurde nun folgendermaßen verfahren:

II. 1 g β-Naphtalinsulfopepton wurde in 10 ccm warmem Eisessig gelöst und 5 ccm einer 20%igen und 5 ccm einer 10%igen Salzsäure hinzugefügt. Hierbei blieb die Lösung noch gerade klar. Dann wurde $2^1/_2$ Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Eine äußere Veränderung war an der Lösung nicht wahrzunehmen. Beim Erkalten fand Abscheidung von Schmieren statt. Es wurde daher weitere $2^1/_2$ Stunden gekocht. Jetzt hatte die Flüssigkeit braune Färbung angenommen. Nach dem Filtrieren wurde eine größere Menge Wasser hinzugefügt (alle β-Naphtalinsulfo- und Nitrotoluolsulfoderivate der Amidosäuren sind in Wasser unlöslich), worauf erst Trübung, dann Abscheidung von Schmieren stattfand. Sie wurden filtriert, in verdünnter Natronlauge gelöst, und diese Lösung in verdünnte Salzsäure eingegossen. Die sich hierbei abgeschiedenen Flocken verschmierten beim Abnutschen vollkommen.

Das Filtrat der ersten Schmieren wurde zur Entfernung des Eisessigs unter öfterem Wasserzusatz eingedamptf. Schließlich fanden minimale Kristallabscheidungen statt. Diese wurden abgenutscht und mit Wasser gewaschen, wobei sie wieder in Lösung gingen. Eine β-Naphtalinsulfoverbindung war es demnach nicht. Das Filtrat wurde wiederum eingedampft, die Kristalle abgenutscht und getrocknet. Die Ausbeute (0,05) war jedoch so gering, daß eine Untersuchung derselben nicht möglich war.

III. Bei einem weiteren Versuch mit 2 g β-Naphtalinsulfopepton, der in derselben Weise ausgeführt wurde, ist diese Kristallabscheidung nicht mehr erhalten worden.

IV. 0,4 g β-Naphtalinsulfopepton wurden in 2 ccm Eisessig gelöst und mit 2 ccm 20%iger HCl eine Stunde am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Erkalten wurde mit Natronlauge neutralisiert und dann wieder mit Salzsäure angesäuert und einige Tage stehen lassen. Kristallabscheidung fand nicht statt.

Die Lösung wurde auf dem Wasserbade eingeengt, der Rückstand mit heißem Alkohol ausgezogen, die alkoholischen klaren Lösungen vereinigt, auf ein geringes Volumen eingedampft und mit einer größeren Menge Wasser versetzt. Die Lösung trübte sich, schied im Verlaufe einiger Tage nur wenige, am Boden des Gefäßes fest sitzende Schmieren aus.

V. 0,4 g β-Naphtalinsulfopepton wurden in 2 ccm Eisessig gelöst und mit 2 ccm 20%iger Salzsäure eine halbe Stunde am Rückflußkühler erhitzt. Durch Eindampfen auf dem Wasserbade wurde der Eisessig verjagt, der ölige Rückstand in heißem Alkohol gelöst, der Alkohol mit Wasser bis zur Trübung versetzt. Wiederum erfolgte nur schmierige Abscheidung. Von dieser wurde filtriert und das Filtrat auf dem Wasserbade eingeengt. Der Rückstand war ein brauner Sirup, aus dem Kristalle nicht erhalten werden konnten.

VI. 1 g Nitrotoluolsulfopepton wurde in 10 ccm Eisessig gelöst und mit 10 ccm 12%iger Salzsäure eine halbe Stunde am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung wurde auf dem Wasserbade eingedampft und der ölige Rückstand in Alkohol suspendiert. Dieser wurde wiederum eingeengt, noch heiß mit Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt, und längere Zeit im Eisschrank aufbewahrt. Wiederum erfolgten nur schmierige Abscheidungen.

Da sich das Arbeiten nach diesem Verfahren als erfolglos erwies, so versuchte ich zunächst einmal festzustellen, wie sich wohl einfachere β-Naphtalinsulfo- resp. Nitrotoluolsulfoderivate unter den gleichen Versuchsbedingungen verhalten würden. War mir dies bekannt, so würde es mir nachher auch sicherlich möglich sein einen Rückschluß auf das Verhalten der komplizierten Peptonderivate zu machen. Herr Professor Siegfried überließ mir hierzu racemisches 4-Nitrotoluol-2-sulfoalanin, während ich mir β-Naphtalinsulfoglycin selbst herstellte.

0,2 g Nitrotoluolsulfoalanin wurden in 2 ccm Eisessig gelöst, und mit 2 ccm 20%iger Salzsäure auf dem Wasserbade eine Stunde erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde mit Natronlauge neutralisiert und mit Salzsäure schwach angesäuert. Auch nach längerem Stehen fand keinerlei Abscheidung statt. Zur Entfernung des Eisessigs, der wahrscheinlich ein Kristallisieren hinderte, wurde unter Wasserzusatz mehrmals zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit heißem Alkohol ausgezogen, dieser

wieder eingeengt und mit Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt. Anderen Tags war das Nitrotoluolsulfoalanin in feinen Nadeln auskristallisiert. Die Ausbeute betrug 0,1 g, also 50% der angewandten Menge.

Bei einem zweiten Versuch, bei dem zwei Stunden am Rückflußkühler erhitzt wurde, konnte das Nitrotoluolsulfoalanin nicht regeneriert werden. Das längere Erhitzen hatte eine Spaltung desselben herbeigeführt.

0,2 g β-Naphtalinsulfoglycin wurde in 2 ccm Eisessig gelöst und mit 2 ccm 20%iger Salzsäure eine halbe Stunde lang am Rückflußkühler erhitzt. Die Lösung wurde hierauf auf dem Wasserbade des öfteren eingedampft, der Rückstand in Alkohol gelöst, filtriert, die alkoholische Lösung eingeengt und mit Wasser bis zur Trübung versetzt. Im Verlaufe von 24 Stunden war das β-Naphtalinsulfoglycin wieder auskristallisiert.

Ausbeute 1,6 g.

Dieser Versuch wurde nun in derselben Weise wiederholt nur mit dem Unterschied, daß das Kochen am Rückflußkühler auf 1, dann auf $1^1/_2$, auf 2, auf $2^1/_2$ und auf 3 Stunden ausgedehnt wurde. Hierbei zeigte sich, daß mit längerem Erhitzen der Verlust des β-Naphtalinsulfoderivates Hand in Hand geht. Nach dreistündigem Erhitzen konnte vollkommene Zersetzung des Derivates festgestellt werden.

Es zeigte sich also, daß bei längerem Kochen mit Salzsäure schon die einfachen Nitrotoluolsulfo- und β-Naphtalinsulfoderivate nicht beständig sind, erstere noch weniger wie die letzteren. Diese Tatsache macht die Möglichkeit, aus meinen Peptonderivaten durch Spaltung einfachere Derivate zu erhalten, recht unwahrscheinlich. Denn zur Spaltung des wahrscheinlich innerhalb des Moleküls fest gebundenen Peptonkomplexes ist ein längeres Erhitzen erforderlich; durch dieses längere Erhitzen erfolgt aber gleichzeitig eine Zersetzung des Naphtalinsulforestes.

Zwei Versuche, der eine bei kurzem, der zweite bei längerem Erhitzen der Peptonderivate mit Salzsäure sollten darüber Aufschluß geben, ob diese Ansicht auch gerechtfertigt ist.

VII. 0,5 g β-Naphtalinsulfopepton wurden in 5 ccm Eisessig gelöst und mit 10 ccm 12%iger Salzsäure auf dem Wasserbade eine Stunde lang erwärmt. Zur Entfernung des Eisessigs wurde

unter jedesmaligem Wasserzusatz des öfteren eingedampft. Der ölige Rückstand wurde in eine große Menge Wasser eingegossen. Das noch unveränderte Derivat schied sich in Flocken aus, die aber schon beim Abnutschen auf dem Filter verschmierten.

VIII. 0,9 g β-Naphtalinsulfopepton wurden in 10 ccm Eisessig gelöst, hierauf tropfenweise so viel 25%iger Salzsäure zugegeben, bis die Flüssigkeit eben noch klar blieb, und 6 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Beim Erkalten erfolgte noch Trübung und Abscheidung von Schmieren, ein Zeichen, daß noch ungespaltenes Peptonderivat in der Lösung vorhanden war.

Nach dem Kochen mit Tierkohle wurde filtriert und die gelb gefärbte Lösung auf dem Wasserbade eingeengt. Der ölige Rückstand schied auch bei längerem Stehen in einer Kältemischung keinerlei Kristalle ab. Er wurde daher wieder in einigen Tropfen Eisessig gelöst, 5 ccm 12%ige Salzsäure zugefügt und nochmals 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Beim Erkalten erfolgte jetzt weder Trübung noch Abscheidung. Die Lösung wurde nach dem Kochen mit Tierkohle filtriert und des öfteren eingedampft, wobei sich diesmal neben einem sirupartigen Rückstand auch Kristalle abschieden, die aber in Wasser löslich waren, also keine Naphtalinsulfoverbindung sein konnten. Wahrscheinlich war es eine durch Spaltung des Peptons entstandene Amidosäure. Die Menge der Kristalle war dementsprechend auch so gering, daß eine Reinigung und Untersuchung derselben nicht möglich war.

Denselben Vergleich im großen zu wiederholen war mir dadurch versagt, daß mir nur kleine Mengen der Peptonderivate zur Verfügung standen. Außerdem kam es für mich in erster Linie nur darauf an, die Frage zu beantworten, ob sich ein β-Naphtalinsulfo- und Nitrotoluolsulfopepsinglutinpepton in der Weise spalten lasse, daß sich die bei der Spaltung aus dem Pepton gebildeten Amidosäuren mit dem Sulfosäurerest zu neuen Derivaten vereinigen würden.

Nach dem Ergebnis der Untersuchungen muß ich diese Frage verneinen.

D. Spaltungen des Peptons.

Schon in der Einleitung war gesagt worden, daß durch die Spaltungen versucht werden sollte, neue Schritte zur Aufklärung der Konstitution des Pepsinglutinpeptons zu tun. Hierzu war

erforderlich, daß sowohl die Stickstoffverteilung innerhalb des Moleküls festgestellt, als auch eine möglichst quantitative Isolierung der einzelnen bei der Spaltung entstehenden Produkte durchgeführt wurde.

a) Stickstoffverteilung im Pepsinglutinpepton.

Die Untersuchung der Stickstoffverteilung geschah nach der von W. Hausmann[1]) ausgearbeiteten, später von M. Siegfried[2]) verbesserten Methode. Hausmann hat die Löslichkeit der Phosphorwolframate bei der Fällung der Spaltungslösung mit Phosphorwolframsäure unberücksichtigt gelassen. Die hierdurch entstehenden nicht unwesentlichen Fehler werden bei Anwendung der Siegfriedschen Modifikation vermieden, da hierbei die Löslichkeit der Phosphorwolframate durch Bestimmung der Korrektionswerte in Anrechnung gebracht werden.

2 g bis zum konstanten Gewicht bei 75° getrocknetes Pepton wurden in 50 ccm Wasser gelöst und mit 25 g konzentrierter Schwefelsäure in einem mit Rückflußkühler versehenen Kölbchen 12 Stunden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Spaltungslösung filtriert und auf ein bestimmtes Volumen (200 ccm) aufgefüllt.

In 10 ccm wurde der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl bestimmt. In einem zweiten Teil wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt.

40 ccm der Spaltungslösung wird mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, hierauf mit einer zu messenden Menge 10%iger Phosphorwolframsäurelösung[3]) gefällt, bis kein Niederschlag mehr erfolgt. Dies prüft man, indem man nach dem Absitzen des Niederschlages mit einer Kapillarpipette eine kleine Menge der klaren Flüssigkeit herausnimmt und im Reagenzglas mit einem Tropfen Phosphorwolframsäurelösung versetzt. Die Proben werden mit Phosphorwolframsäurelösung, wenn die Fällung noch nicht beendet ist, sonst mit etwas Wasser zurückgespült. Nach be-

---

[1]) W. Hausmann, Ztschr. für physiol. Chem. **27,** 95 (1899).

[2]) M. Siegfried, Ztschr. für physiol. Chem. **43,** 56 (1904).

[3]) Die käufliche Phosphorwolframsäure wurde stets durch Ausschütteln mit Äther (nach Drechsel) gereinigt.

endeter Fällung wird mit Wasser aufgefüllt, bis der Gesamtgehalt der Flüssigkeit an Schwefelsäure etwa 5% beträgt. Dann wird auf dem Wasserbade erwärmt bis der größte Teil des Niederschlages in Lösung gegangen ist. Nach 12 Stunden wird der Niederschlag abgesaugt und mit einem gemessenen Volumen 5%iger Phosphorwolframsäure- und 5%iger Schwefelsäurelösung nachgewaschen. Das Filtrieren geschieht bei einer Temperatur von 20°; ebenso hat die Waschflüssigkeit dieselbe Temperatur.[1]) Niederschlag und Filtrat werden direkt mit Schwefelsäure kjeldahlisiert. Die Verbrennung mit Schwefelsäure geschieht am vorteilhaftesten in dem von M. Siegfried[2]) konstruierten Schüttelapparat, da bei Anwendung dieses Apparates jegliches Stoßen vermieden wird.

Bei der Fällung mit Phosphorwolframsäure bleibt ein Teil der Wolframate in Lösung; ebenso lösen sich geringe Mengen des Niederschlages beim Waschen mit 5%iger Phosphorwolframsäure- und 5%iger Schwefelsäurelösung. Ohne Berücksichtigung dieser Tatsache würde der fällbare Stickstoff zu niedrig, der nicht fällbare zu hoch gefunden werden; bei ersterem müssen also die für die Löslichkeit der Wolframate gefundenen Werte addiert, bei letzterem subtrahiert werden.

Zur Bestimmung der Korrektionswerte ist demnach festzustellen, wieviel des betreffenden Wolframates unter denselben Bedingungen in einer 5%igen Schwefelsäure- und 5%igen Phosphorwolframsäure gelöst ist.

In 40 ccm Spaltungslösung wurde der Phosphorwolframsäureniederschlag erzeugt, derselbe abgenutscht, gewaschen und in 500 ccm einer 5%igen Phosphorwolframsäure- und 5%igen Schwefelsäurelösung eingetragen. Auf dem Wasserbade wurde erwärmt, bis der größte Teil des Niederschlags in Lösung gegangen war und andern Tags bei 20° Temperatur abgesaugt. Das Filtrat wurde im Kjeldahlkolben eingedampft und fertig kjeldahlisiert.

Die verbrauchten ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4 sind die Werte für die anzubringende Korrektur.

---

[1]) Diese Temperatur muß genau eingehalten werden, da ein Überschreiten zu wesentlichen Fehlern führt.

[2]) M. Siegfried, Ztschr. f. physiol. Chem. **41**, 1 (1904).

1. 500 ccm verbrauchten 8,3 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4
2. 500 „ „ 8,1 „ „ „

Im Mittel: 8,2 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4.

Für ein Liter sind aber 16,4 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4 in Berechnung zu bringen.

Für das Waschwasser kann nach den Befunden M. Siegfrieds,[1]) ohne daß ein wesentlicher Fehler entsteht, die Hälfte des Korrektionswertes angenommen werden, also für 1 Liter 8,2 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4.

Gesamtstickstoff.

1. 10 ccm verbrauchten 12,3 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4
2. 10 „ „ 12,5 „ „ „

Im Mittel: 12,4 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4,

entsprechend 0,01736 g N.

200 ccm würden also 248 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4 verbrauchen, entsprechend 0,3472 g N.

Der Stickstoffgehalt des zur Spaltung verwendeten Pepsinglutinpeptons betrug 17,3 %. Es entsprechen also diese 0,3472 g N = 2,006 g Pepton.

Durch Phosphorwolframsäure fällbarer Stickstoff.

1. 40 ccm verbrauchten 12,2 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4
2. 40 „ „ 12,3 „ „ „

Im Mittel: 12,25 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4.

\+ Korrektion (für 100 ccm und 50 ccm Waschflüssigkeit) 2,05 „ „ „

14,30 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4,

entsprechend 0,02002 g N.

In 200 ccm sind also 71,5 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4, entsprechend 0,01001 g N = 28,83 % des Gesamtstickstoffs.

Durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Stickstoff.

1. 40 ccm verbrauchten 36 5 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4
2. 40 „ „ 36,7 „ „ „

Im Mittel: 36,6 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4.

— Korrektion 2,05 „ „ „

34,55 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4,

entsprechend 0,04837 g N.

[1]) M. Siegfried, Ztschr. f. physiol. Chem. **43**, 46 (1904).

In 200 ccm sind also 172,75 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4, entsprechend 0,24185 g N = 69,56 % des Gesamtstickstoffs.

Zusammenstellung der Resultate.

Gesamtstickstoff	$^{n}/_{10}$ H_2SO_4 448 ccm	0,3472 g N	—
Mit Phosphorwolframsäure fällbarer Stickstoff	71 ccm	0,1001 g N	28,83 %
Mit Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Stickstoff	172,75 ccm	0,24185 g N	69,56 %
		Summe:	98,39 %

b) Qualitative und quantitative Spaltung von Pepsinglutinpepton.

20 g Pepton (III. Dastellung) wurden in der Mischung von 150 ccm Wasser und 75 g konzentrierter Schwefelsäure in einem mit Rückflußkühler versehenen kleinen Erlenmeyer zum Sieden erhitzt. Die Spaltungslösung färbte sich schon nach kurzer Zeit dunkelbraun, doch schieden sich nur Spuren von Huminsubstanzen ab. Von diesen wurde filtriert und das Filtrat auf 500 ccm aufgefüllt.

In viermal je 5 ccm wurde der Gesamtstickstoff bestimmt.

1. 5 ccm verbrauchten 24,6 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4
2. 5 „ „ 24,5 „ „ „
3. 5 „ „ 24,3 „ „ „
4. 5 „ „ 24,3 „ „ „

Im Mittel: 24,43 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4,

entsprechend 0,0342 g N.

500 ccm verbrauchten demnach 2443 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4, entsprechend 3,4202 g N.

Der Stickstoffgehalt der III. Peptondarstellung betrug 17,3 %. Wären die zur Spaltung verwendeten 20 g Pepton bis zum konstanten Gewicht getrocknet gewesen, so würde der Verbrauch an $^{n}/_{10}$ H_2SO_4 = 2471 ccm betragen haben.

Aus den gefundenen g N läßt sich andrerseits berechnen, wieviel g getrocknetem Pepton die in Anwendung gebrachte Menge entspricht. 3,4202 g N entsprechen 19,7687 g Pepton.

Nach Feststellung des Stickstoffgehaltes wurde die Spaltungslösung (480 ccm), um ihr einen Schwefelsäuregehalt von 5 % zu geben, auf 1440 ccm aufgefüllt.

In dieser Lösung wurde der Phosphorwolframsäureniederschlag erzeugt. Gefällt wurde zunächst mit 10%iger, dann mit 30%iger und zum Schluß wieder mit 10%iger Phosphorwolframsäurelösung. Der jedesmalige Zusatz betrug 50 ccm 10%iger, 200 ccm 30%iger und 20 ccm 10%iger Lösung. Auf dem Wasserbade wurde erwärmt, bis der größte Teil des Niederschlages in Lösung gegangen war, nach 16 Stunden bei 20° Temperatur abgesaugt und mit 200 ccm 5%iger Phosphorwolframsäure- und 5%iger Schwefelsäurelösung nachgewaschen.

I. Der Phosphorwolframsäureniederschlag.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde unter Zusatz von Ammoniak in Wasser gelöst und zur Entfernung der Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure mit Baryt in geringem Überschuß versetzt. Der Niederschlag wurde abgenutscht, gut mit heißem Wasser gewaschen und zur Vermeidung jeglichen Verlustes in der Reibschale noch mehrere Male mit heißem Wasser verrieben und wieder genutscht. Filtrat und Waschwässer wurden vereinigt und in denselben der Baryt durch Zusatz von Ammonkarbonat gefällt. Das klare Filtrat wurde mehrmals zur Trockne eingedampft, der Rückstand dann in wenig Wasser aufgenommen, nochmals filtriert und auf 250 ccm aufgefüllt.

In 10 ccm dieser Basenlösung wurde der Stickstoff bestimmt.

I. 10 ccm verbrauchten 26,7 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4
II. 10 „ „ 26,7 „ „ „
Im Mittel: 26,7 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4,

entsprechend 0,0374 g N.

250 ccm verbrauchten 667,5 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4
+ Korrektion (für 1400 ccm 5%iger Phosphorwolframsäure- und 5%iger H_2SO_4-Lösung 25,2 „ „ „
692,7 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4,

entsprechend 0,9698 g N = 28,35% des Gesamtstickstoffs.

Ohne Korrektion berechnet sich der Stickstoffgehalt zu 27,32% des Gesamtstickstoffs.

Ich führe diese Zahl mit an, da dieser Prozentgehalt dem wirklich in der „Basenlösung“ enthaltenen Stickstoff entspricht.

Wie Scheermesser[1]) nachgewiesen hat, bestehen die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Spaltungsprodukte nur aus Arginin und Lysin.

Zur Bestimmung des Arginin-Lysinverhältnisses wurde ein aliquoter Teil der „Basenlösung“ (10 ccm) in einem weithalsigen Stöpselglase mit heiß gesättigter Silbersulfatlösung versetzt, bis ein herausgenommener Tropfen mit Barytwasser Gelbfärbung gab. Nach dem Erkalten wurde in die, den flockigen Niederschlag von Argininsilber enthaltende Flüssigkeit fein gepulverter Baryt unter jedesmaligem tüchtigen Umschütteln eingetragen, bis Barytkristalle am Boden ungelöst blieben. Hierdurch wird das Argininsilbernitrat in das basische Salz übergeführt, das in Barytwasser unlöslich ist. Der schnell braun werdende Niederschlag wurde abfiltriert und mit kalt gesättigtem Barytwasser nachgewaschen. Der Niederschlag wurde mit dem Filter[2]) in den Kjeldahlkolben gebracht und ebenso wie das Filtrat am Siegfriedschen Schüttelapparat fertig kjeldahlisiert.

I. Niederschlag (Arginin).

1. 10 ccm verbrauchten 18,4 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4
2. 10 „ „ 18,6 „ „ „

Im Mittel: 18,5 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4

entsprechend 0,0267 g N.

250 ccm verbrauchen 462,5 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4, entsprechend 0,6375 g N = 18,93 % des Gesamt- und 69,29 % des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs.

II. Filtrat (Lysin).

1. 10 ccm verbrauchten 8,2 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4
2. 10 „ „ 8,2 „ „ „

Im Mittel: 8,2 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4,

entsprechend 0,0115 g N.

250 ccm verbrauchen 205 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4, entsprechend 0,2870 g N = 8,39 % des Gesamt- und 30,71 % des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs.

[1]) F. W. Scheermesser, Ztschr. f. physiol. Chem. **41**, 61 (1904).

[2]) Das Filter war auf Stickstofffreiheit geprüft worden.

Zusammenstellung der Resultate.

% Arginin des Gesamtstickstoffs	% Lysin des Gesamtstickstoffs	% Arginin des durch P.-W.-S. fällbaren Stickstoffs	% Lysin des durch P.-W.-S. fällbaren Stickstoffs
18,93 %	8,39 %	69,29 %	30,71 %
27,32 %		100,00 %	

vorher gefunden: 27,32 %.

Der Rest der Basenlösung (210 ccm) wurde zur Trennung des Arginins vom Lysin mit heiß gesättigter Silbersulfatlösung versetzt, Baryt eingetragen, der Niederschlag dann abgenutscht und mit Barytwasser nachgewaschen.

Zur weiteren Identifizierung des Arginins diente das Kupfersalz, das zuerst von Schulze und Steiger[1]) dargestellt wurde.

Der Argininsilbernitratniederschlag wurde in Wasser suspendiert, einige Tropfen Schwefelsäure zugesetzt (bis Kongopapier schwach gefärbt war) und das Silber durch Einleiten von Schwefelwasserstoff gefällt. Im Filtrat wurde durch längeres Erhitzen der Schwefelwasserstoff verjagt die Schwefelsäure durch Baryt, dieser durch Ammonkarbonat entfernt.

Das klare Filtrat wurde auf dem Wasserbade gut zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und auf etwa 200 ccm verdünnt. Zur Bestimmung des Argiringehaltes wurde mit $^{n}/_{10}$ Salpetersäure titriert. Als Indikator wurden einige Tropfen alkoholischer Phenolphtalein zugesetzt; auch hier zeigte sich wieder, daß Phenolphtalein ein schlechter Indikator auf Hydroxylionen ist. Obgleich Entfärbung der Lösung eingetreten war, wurde Lakmuspapier noch stark gebläut. Ich titrierte daher so lange weiter, bis Lakmus neutrale Reaktion zeigte. Hierzu waren 70 ccm $^{n}/_{10}$ Salpetersäure erforderlich, was einem Argiringehalt von 1,22 g entspricht.

Zu der salpetersauren Argininlösung wurde nochmals das gleiche Volumen (70 ccm) $^{n}/_{10}$ Salpetersäure hinzugefügt und mit der dreifachen berechneten Menge Kupferkarbonat, das durch vorheriges Aufkochen in Wasser und durch öfteres Auswaschen gereinigt war, versetzt. Es wurde längere Zeit erhitzt, vom über-

[1]) Schulze u. Steiger, Ztschr. f. physiol. Chem. **11**, 52 (1887).

schüssigen Kupferkarbonat abfiltriert und das klare dunkelblaue Filtrat auf dem Wasserbade auf ein geringes Volumen eingeengt.

Nach dreiwöchentlichem Stehen hatten sich reichlich Kristalle von Argininkupfernitrat abgeschieden, die auf einer kleinen Nutsche abgesaugt, mit etwas eiskaltem Wasser gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet wurden.

Ausbeute: 1,85 g.

Das kristallwasserhaltige Salz schmilzt bei 112°—114° in seinem Kristallwasser; kristallwasserfrei schmilzt es unter starker Zersetzung bei 234° unkorrigiert. Wl. Gulewitsch[1]) gibt als Schmelzpunkt 112°—114° resp. 232°—234°, O. Riessner[2]) 113° resp. 234° an.

Im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewicht getrocknet, verlor es einen Teil seines Kristallwassers.

Dieses ist auch schon von Schulze und Steiger[3]) beobachtet worden, die daher das Kupfersalz über Chlorcalcium trockneten. Hedin[4]) konnte in einem Teil des Salzes, der etwa 3 Wochen über Schwefelsäure getrocknet war, nur noch 2,66 % Kristallwasser finden.

1. 0,1058 g verloren bei 110° 0,0098 g an Gewicht.
2. 0,0960 g der bei 110° getrockneten Substanz hinterließen nach dem Glühen 0,0143 g CuO.

Berechnet für $(C_6H_{14}N_4O_2)_2 \cdot Cu \cdot (NO_3) + 3H_2O$:	Gefunden:
$H_2O = 9{,}16\ \%$	$H_2O = 9{,}26\ \%$
$Cu = 11{,}88\ \%$	$Cu = 11{,}9\ \%$.

Das Argininkupfernitrat enthielt 3 Mol. Kristallwasser.

Schulze und Steiger,[3]) Hedin[4]) und O. Riessner[5]) fanden denselben Kristallwassergehalt, während es nach Wl. Gulewitsch[6]) $3\frac{1}{2}$ Mol. enthalten soll.

---

[1]) Wl. Gulewitsch, Ztschr. f. physiol. Chem. **27**, 169 (1899).
[2]) O. Riessner, Ztschr. f. physiol. Chem. **49**, 118 (1906).
[3]) Schulze u. Steiger, Ztschr. f. physiol. Chem. **11**, 51 (1887).
[4]) Hedin, Ztschr. f. physiol. Chem. **20**, 191 (1895).
[5]) O. Riessner, a. a. O.
[6]) M. Gulewitsch, a. a. O.

Im Filtrat des Silbernitratniederschlages, in dem sich das Lysin befand, wurde das Silber durch Einleiten von Schwefelwasserstoff gefällt, dieser durch Kochen verjagt, die Schwefelsäure durch Baryt und dieser wieder durch Ammonkarbonat entfernt. Das klare Filtrat, das jetzt außer Lysin nur noch Ammonkarbonat enthält, wurde in einer gewogenen Kristallisierschale auf dem Wasserbade mehrmals zur Trockne eingedampft und noch längere Zeit (ca. 3 Wochen) im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

Die Ausbeute an Lysin betrug 1,4580 g.

Zur Überführung des Lysins in eins seiner Salze eignet sich wohl am besten das zuerst von A. Kossel[1]) dargestellte Pikrat.

Der Lysin darstellende Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst und die berechnete Menge Pikrisäure (Kossel verwendete bei seiner Darstellung Natriumpikrat) in 50 ccm Wasser gelöst, zugesetzt. Die Lösung wurde eine Zeit lang auf dem Wasserbade erwärmt und zur Kristallisation stehen lassen. Diese erfolgte schon reichlich innerhalb 24 Stunden. Von den Kristallen wurde abgenutscht und die Mutterlauge nochmals eingeengt, wodurch eine zweite Abscheidung von Lysinpikrat erreicht wurde.

Ausbeute: 1,9 g.

Das Lysinpikrat schmilzt unter starker Zersetzung bei 250° unkorr.

Die bei 120° bis zum konstanten Gewicht getrocknete Substanz ergab folgenden Analysenwert:

0,1832 g gaben 29,6 ccm trocknen N bei 18° und 762 mm Bar.

Ber. für $C_6H_{14}N_2 \cdot O_2 \cdot C_6H_2(NO_2)_3 \cdot OH$: N = 18,66 %. Gefunden: N = 18,63 %.

II. Das Filtrat des Phosphorwolframsäure-Niederschlags.

Im Filtrat des Phosphorwolframsäure-Niederschlages wurde die Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure mit Baryt gefällt und dieser dann mit Ammonkarbonat gefällt, wobei genau in der beim Niederschlag angegebenen Weise verfahren wurde. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade gut zur Trockne eingedampft.

Der Rückstand wurde wieder in Wasser aufgenommen, nochmals filtriert und auf 200 ccm aufgefüllt.

---

[1]) A. Kossel, Ztschr. f. physiol. Chem. **25**, 180 (1898).

Zweimal je 2 ccm dieser Lösung wurden in gewogene Stöpselgläschen pipettiert, im Trockenschrank eingedampft und bei 80° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. In beiden wurde der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

1. 2 ccm = 0,1452 g verbrauchten 17 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
N = 16,39 %.

2. 2 ccm = 0,1430 g verbrauchten 16,8 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
N = 16,45 %.

Dieser Stickstoffgehalt läßt darauf schließen, daß ein wesentlicher Teil der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Spaltungsprodukte Glykokoll (N = 18,6 %) sein muß. Der Stickstoffgehalt der andern hier in Betracht kommenden Amidosäuren ist wesentlich geringer.

Um zu sehen, ob ein einmaliges Eindampfen des die nicht fällbaren Spaltungsprodukte enthaltenden Rückstands genügt hatte, um alles Ammoniak zu entfernen, wurde 1 ccm der auf 200 ccm aufgefüllten Spaltungslösung ohne vorheriges nochmaliges Eindampfen kjeldahlisiert.

1 ccm verbrauchte 8,5 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.

Es ergibt sich hier ein Wert, der mit den oben gefundenen gut übereinstimmt; freies Ammoniak war also nicht mehr vorhanden.

Aus den gefundenen ccm $^n/_{10}$ Säure berechnet sich der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Stickstoff:

1 ccm verbrauchte 8,5 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4,
entsprechend 0,0119 g N.

200 ccm verbrauchen 1700 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
+ Korrektur (für 1400 ccm 5 %iger P.-W.-S.-H_2SO_4-Lösung und 20 ccm Waschflüssigkeit) 25,2 „ „ „
1674,8 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4,
entsprechend 2,3437 g N = 68,56 % des Gesamtstickstoffs.

Nach Feststellung des Stickstoffgehaltes wurde der Rest der auf 200 ccm aufgefüllten Spaltungslösung (195 ccm) auf dem Wasserbade eingeengt und vorsichtig in einen kleineren mit eingeschliffenem Stopfen versehenen Erlenmeyer gespült. Nachdem gut in Eis gekühlt war, wurde unter ständiger weiterer Eiskühlung getrocknetes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet.

Gut verschlossen wurde 14 Tage bei gewöhnlicher Temperatur stehen lassen. Da innerhalb dieser Zeit eine Abscheidung von Glutaminsäurechlorhydrat nicht stattgefunden hatte, so wurde ein winziges Kriställchen dieses Salzes eingeimpft und die Lösung zur Kristallisation im Eisschrank aufbewahrt. Hierdurch wurde die Kristallisation bedeutend gefördert, denn jetzt hatte sich schon nach zwei Tagen reichlich Chlorhydrat abgeschieden. Nach weiterem 14tägigen Stehen im Eisschrank wurde von den Kristallen abgenutscht und dieselben so lang mit eiskalter rauchender Salzsäure nachgewaschen, bis sie rein weiß waren.

Über Ätzkali getrocknet wogen sie 1,7 g.

Zur besseren Reinigung wurde nochmals umgefällt und zwar in der Weise, daß in Wasser gelöst, filtriert, das Filtrat wieder eingeengt und unter Eiskühlung mit Salzsäuregas gesättigt wurde.

Ausbeute 1,4 g.

Zur Identifizierung diente die Bestimmung des Stickstoffgehaltes und die Polarisation.

Die zur Analyse verwendete Substanz wurde über Ätzkali bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

0,2124 g Substanz verbrauchten 17 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4.

Berechnet für $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$:	Gefunden:
N = 7,74 %	N = 7,91 %.

Zur Bestimmung der optischen Drehung wurde die abgewogene Menge Substanz im 20 ccm-Kölbchen in 20 % Salzsäure gelöst und im 2 dcm-Rohr polarisiert.

$c = 2{,}4950$
$t = 20^{0}$
$l = 2$ dcm $\quad [\alpha_D]^{20} = +23{,}25^{0}$.
$\alpha = +1{,}16$
$(\pm 0{,}01)$

Daraus berechnet sich für die Glutaminsäure $C_3H_5NH_2(COOH)_2$:

$$[\alpha_D]^{20} = +28{,}94^{0}.$$

Herr Prof. M. Siegfried hatte die Liebenswürdigkeit diese Polarisation mit mir auszuführen.

Für das spezifische Drehungsvermögen der Glutaminsäure sind verschiedene Werte gefunden worden. E. Fischer und

Th. Doerpinghaus,[1]) die auch in 20 % HCl lösten, beobachteten für Glutaminsäure aus

Gelatine + 30,85°
Kasein + 28,21°
Horn + 31,91°

E. Fischer[2]) aus Leim + 28,21°

F. Müller[3]) gibt für Glutaminsäure aus „Antipepton α“ + 30,62° an.

Das Filtrat des Glutaminsäurechlorhydrates wurde auf dem Wasserbade wieder eingeengt und zur weiteren Kristallisation im Eisschrank aufbewahrt. Schon noch drei Tagen hatte weitere reichliche Kristallisation stattgefunden.

Um zu sehen, ob diese zweite Abscheidung auch noch reines Glutaminsäurechlorhydrat sei, wurden die Kristalle zunächst trocken unter dem Mikroskop betrachtet, und dieselben dann mit einem Tropfen rauchender Salzsäure angefeuchtet, von der Erwägung ausgehend, daß in rauchender Salzsäure nur Glutaminsäurechlorhydrat unlöslich sei.

Da die Kristalle nicht in Lösung gingen, so war diese zweite Abscheidung ebenfalls Glutaminsäurechlorhydrat.

Das Nutschen des Kristallbreis bereitete diesmal große Schwierigkeit:

Um möglichst alles Chlorhydrat zur Abscheidung zu bringen, war bis zum dickflüssigen Sirup eingedampft worden. Durch die schmierigen Beimengungen setzte sich nun beim Nutschen, trotzdem über Glaswolle gesaugt wurde, dieselbe bald so zu, daß kaum ein Tropfen mehr durchlief. Ich brachte daher den ganzen Kristallbrei nochmals in die Kristallisierschale zurück und dekantierte langsam mit eiskalter rauchender Salzsäure, wodurch sich denn auch ein wesentlich besseres Nutschen der Kristalle erreichen ließ. Verluste hatten sich natürlich trotz vorsichtigen Arbeitens hierbei nicht vermeiden lassen.

Ausbeute 1,5 g.

---

[1]) E. Fischer und Th. Doerpinghaus, Ztschr. f. physiol. Chem. **36**, 475 (1903).

[2]) E. Fischer, P. A. Levene und R. H. Aders, ebenda **33**, 78 (1902).

[3]) F. Müller, ebenda **38**, 265 (1903).

Nach einmaligem Umfällen gab die über Ätzkali bis zum konstanten Gewicht getrocknete Substanz für N folgenden Analysenwert:

0,1834 g verbrauchten 10,2 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4.

Berechnet für $C_3H_5 \cdot NH_2 \cdot (COOH)_2 \cdot HCl$:	Gefunden:
N = 7,74 %	N = 7,79 %.

Die zweite Kristallabscheidung war, wie ja auch angenommen, reines Glutaminsäurechlorhydrat.

Die Ausbeute an Glutaminsäurechlorhydrat betrug 3,2 g. Da der Stickstoffgehalt desselben sich zu 7,74 % berechnet, so entsprechen diese 3,2 g = 0,2477 g N. Von dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoff (2,3800 g N) kommen also 10,39 % auf den Glutaminsäurestickstoff.

Das Filtrat der zweiten Abscheidung von Glutaminsäurechlorhydrat wurde wiederum auf dem Wasserbade eingedampft und in der Kälte mit Salzsäuregas gesättigt. Schon nach 24 Stunden war Kristallisation des Sirups eingetreten. Genau wie oben angegeben, wurde mit eiskalter rauchender Salzsäure auf den Trichter dekantiert und mit der kalten rauchenden Salzsäure nachgewaschen. Hierbei gingen jedoch die Kristalle wieder in Lösung.

Glutaminsäurechlorhydrat konnte hier also nicht mehr vorliegen.

Die Lösung wurde auf dem Wasserbade wieder bis zum dickflüssigen Sirup eingeengt und jetzt ohne vorheriges Sättigen mit Salzsäure im Eisschrank belassen. Nach mehreren Tagen war der ganze Sirup zu einem Kristallbrei erstarrt. Da sich eine Probe dieser Kristalle in Aceton unlöslich erwies, so wurde die ganze Abscheidung mit Aceton aufs Filter dekantiert und mit Aceton gut gewaschen. Ausbeute 2,8 g.

1 g dieser Kristalle wurde aus Aceton umkristallisiert. Nach dem Trocknen bis zum konstanten Gewicht ergaben sich folgende Analysenwerte:

0,1656 g Substanz verbrauchten 21,2 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4.

Berechnet für $CH_2 \cdot NH_2 \cdot COOH \cdot HCl$:	Gefunden:
N = 12,61 %.	N = 17,92 %.

0,1700 g Substanz gaben 0,3092 g AgCl.

Berechnet für $CH_2 . NH_2 \cdot COOH \cdot HCl$:	Gefunden:
Cl = 31,53 %	Cl = 44,87 %.

Beide Werte sind für Glykokollchlorhydrat berechnet entschieden zu hoch, was wahrscheinlich auf die Anwesenheit von Chlorammonium zurückzuführen ist.

Um reines Glykokoll zu erhalten, wurden die Kristallabscheidungen vereinigt, in einem nicht zu großen Erlenmeyer mit etwa 40 ccm absolutem Alkohol zum Sieden erhitzt und tropfenweise so lange Wasser zugesetzt, bis alles gelöst war. Hierauf wurde bis zur bleibenden Trübung mit ammoniakalischem Alkohol versetzt. Schon beim Abkühlen schieden sich nadelförmige Kristalle aus. Nachdem nach drei Tagen eine Vermehrung derselben nicht mehr eintrat, wurden sie abgenutscht und mit absolutem Alkohol gewaschen.

Die getrockneten Kristalle zeigten noch immer starke Chlorreaktion. Zur Entfernung des Chlorammoniums wurde sie am Rückflußkühler mehrere Male mit absolutem Alkohol ausgekocht und schließlich die Kristalle durch Zusatz von wenig Wasser wieder in Lösung gebracht. Mit ammoniakalischem Alkohol bis zur Trübung versetzt, schied die Lösung im Verlaufe einiger Tage reichlich Kristalle ab, die jetzt vollkommen chlorfrei waren.

Um zu sehen, ob diese Kristalle wohl reines Glykokoll, frei von jeder anderen Amidosäure sei, wurde ein Teil desselben polarisiert. Dabei war eine, wenn auch nur ganz minimale Drehung festzustellen.

Das Glykokoll wurde daher nochmals umkristallisiert.

Eine Ablenkung des polarisierten Lichtstrahls konnte jetzt nicht mehr wahrgenommen werden.

0,1040 g Substanz verbrauchten 13,7 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.

Berechnet für $CH_2 \cdot NH_2 \cdot COOH$:	Gefunden:
N = 18,66 %	N = 18,45 %.

Der Schmelzpunkt lag bei 240°.

Da Glykokoll meist nicht in solch feinen Nadeln kristallisiert wie dies hier der Fall war, so wurden, da ja möglicherweise eine andere Verbindung vorliegen konnte, einige Kriställchen in einer Achatreibschale mit etwas reinem Glykokoll innig verrieben.

War dies ein Gemisch verschiedener Körper, so war auch eine bedeutende Erniedrigung des Schmelzpunktes zu erwarten. Schmelzpunkt 240°.

Bei der Übereinstimmung des Schmelzpunktes konnte ich daher die feinen Kristalle mit Bestimmtheit als Glykokoll ansehen.

Die jedesmaligen Mutterlaugen und Waschalkohole der einzelnen Glykokollabscheidungen wurden vereinigt, zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und zur Entfernung des noch in der Lösung enthaltenen Chlors mit heiß gesättigter Silbersulfatlösung in geringem Überschuß versetzt. Durch Einleiten von Schwefelwasserstoff wurde das Silber gefällt, der Schwefelwasserstoff durch Kochen verjagt, die Schwefelsäure durch Baryt, dieser wieder mit Ammonkarbonat entfernt. Die klare Lösung wurde auf dem Wasserbade eingeengt und im 2 dcm-Rohr polarisiert, um zu sehen, ob eine optisch aktive Amidosäure in der Lösung vorhanden sei. Es war jedoch nur ganz schwache Drehung wahrzunehmen. Die polarisierte Lösung wurde mit Alkohol bis zur Trübung versetzt. Die abgeschiedenen Kristalle wurden getrocknet und nochmals umgefällt.

Nach dem Umfällen war eine Ablenkung nicht mehr zu bemerken. Aus der zur Polarisation benutzten Lösung wurde durch Zusatz von Alkohol das Glykokoll wieder auskristallisiert.

0,1248 g Substanz verbrauchten 16,7 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.

Berechnet für $CH_2 \cdot NH_2 \cdot COOH$:	Gefunden:
$N = 18{,}66\,\%$.	$N = 18{,}73\,\%$.

Die Mutterlauge der ersten Abscheidung von Glykokollchlorhydrat, in dem sich noch die Hauptmenge der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Amidosäuren befand, wurde auf dem Wasserbade bis zum dickflüssigen Sirup eingeengt. Ein Kristallabscheiden erfolgte jetzt nicht mehr. Der Rückstand wurde mit Wasser verdünnt und auf 250 ccm aufgefüllt und in 5 ccm der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

1. 5 ccm verbrauchten 18,8 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4
2. 5 „ „ 19,0 „ „ „

Im Mittel: 18,9 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4,

entsprechend 0,0265 g N.

250 ccm verbrauchen also 945 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4, entsprechend 1,3230 g N.

Ist in diesem letzten Spaltungsrest (250 ccm) nur Glykokoll, so entsprechen diese 1,3230 g N, da der Stickstoffgehalt des Glykokolls 18,67% beträgt, einem Gehalt von 7,086 g.

Zur Entfernung des Chlors wurde die Lösung (240 ccm) mit heiß gesättigter Silbersulfatlösung in geringem Überschuß versetzt. Das Silber wurde im Filtrat durch Einleiten von Schwefelwasserstoff gefällt, dieser durch längeres Kochen verjagt, die Schwefelsäure durch Baryt und dieser wieder durch Ammonkarbonat entfernt. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade bis zum dickflüssigen Sirup eingeengt.

Schon vorher (vergl. S. 22) hatte ich mitgeteilt, daß es M. Siegfried[1]) gelungen war, aus einem Gemisch von Aminosäuren nit Hilfe seiner Karbaminoreaktion die Aminosäuren zu reinigen und zu isolieren. Speziell beim Glykokoll vermochte er eine quantitative Trennung zu erreichen.

Da sich in dem vorliegenden Sirup in der Hauptsache Glykokoll befand, so versuchte ich dasselbe mit Hilfe dieser Methode zu isolieren.

Der Aminosäuresirup wurde sorgfältig mit etwas Wasser in ein 2 l fassendes, mit eingeschliffenem Stopfen versehenes Glas gespült, mit 1000 ccm kalt gesättigter Barytlösung versetzt, gut in Eis gekühlt und, nach dem Zusatz einiger Tropfen Phenolphtaleïn, Kohlensäure bis zur schwach alkalischen Reaktion eingeleitet. Sodann wurde überschüssige Barytlösung zugesetzt und 12 Stunden bei 0° stehen lassen. Da nach dieser Zeit die Flüssigkeit wieder neutrale Reaktion zeigte, (Phenolphtaleïn war entfärbt) so wurde nochmals Baryt bis zur starken Alkalescenz zugegeben und auf der Nutsche abgesaugt. Der Rückstand wurde in Wasser suspendiert, auf dem Wasserbade erwärmt, in der Wärme mit Ammonkarbonat digeriert, filtriert und gut mit heißem Wasser gewaschen. Das klare Filtrat wurde in einer gewogenen Glasschale zur Trockne eingedampft und im evakuierten Exikkator über Schwefelsäure getrocknet.

Das Filtrat des Karbaminoniederschlages wurde mit fein gepulvertem Baryt gesättigt, wieder Kohlensäure eingeleitet, dann ein größerer Überschuß an Baryt zugegeben, abgenutscht und der Niederschlag wie oben angegeben behandelt.

---

[1]) M. Siegfried, Berl. Ber. **39**, 297 (1906).

Das Filtrat der zweiten Fällung wurde bei Zimmertemperatur mit Kohlensäure gesättigt, in der Wärme noch etwas Ammonkarbonat zugesetzt und vom Niederschlag filtriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade eingeengt.

Auf diese Weise erhielt ich drei Fraktionen.

Nach den Befunden M. Siegfrieds geht bei der Karbaminierung das Glykokoll in den Niederschlag. Ich mußte also auch hier das Glykokoll in den beiden ersten Fraktionen vermuten. Die im Exsikkator über Schwefelsäure getrockneten Rückstände betrugen:

Fraktion I 1,6702 g
„ II 0,7680 g.

Sie wurden in wenig Wasser aufgenommen, vereinigt und in ca. 400 ccm siedenden absoluten Alkohol eingegossen. Nach 24 Stunden hatten sich nur minimale Mengen Glykokoll schmierig am Boden des Gefäßes abgeschieden. Von den Schmieren wurde filtriert, das alkoholische Filtrat auf dem Wasserbade bedeutend eingeengt und zur Kristallisation längere Zeit im Eisschrank stehen lassen. Hierbei fanden jedoch wiederum nur schmierige Abscheidungen statt. Es wurde daher wieder so viel Wasser hinzugefügt, bis alles gerade in Lösung ging und nun durch täglichen Zusatz von wenig Alkohol, später Äther, versucht, das Glykokoll in reinen Kristallen zur Abscheidung zu bringen. Gute Kristallisation war aber auch so nicht zu erreichen.

Da das Kupfersalz des Glykokolls leicht gut kristallisiert zu erhalten ist, so versuchte ich jetzt das Glykokoll in dieses Salz überzuführen.

Alkohol und Äther wurden auf dem Wasserbade verdampft, der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen und die Lösung mit frisch gefälltem Kupferoxydhydrat längere Zeit erhitzt. Vom überschüssigen Oxydhydrat wurde filtriert, das dunkelblaue Filtrat eingeengt. Der Rückstand wurde zur Trennung vom Kupfersalz einer vielleicht vorhandenen anderen Amidosäure mit Methylalkohol ausgekocht, wobei jedoch nur Spuren in Lösung gingen.

Zur größeren Reinigung wurde das Glykokollkupfer in wenig Wasser gelöst und durch Zusatz von Alkohol auskristallisiert. Nach 24 Stunden wurde von den Kristallen filtriert und aus der Mutterlauge durch weiteren Alkoholzusatz eine zweite Kristallisation erhalten.

Die erhaltenen Werte stimmten gut auf Glykokollkupfer.

0,1034 g der über Schwefelsäure getrockneten Substanz verloren bei 110° 0,0080 g an Gewicht.

Berechnet für $(CH_2 \cdot NH_2 \cdot COO)_2Cu + H_2O$: $H_2O = 7{,}84\,\%$. Gefunden: $H_2O = 7{,}74\,\%$.

0,0954 g der bei 110° getrockneten Substanz hinterließen nach dem Glühen 0,0358 g CuO.

Berechnet für $(CH_2 \cdot NH_2 \cdot COO)_2Cu$: $Cu = 30{,}05\,\%$. Gefunden: $Cu = 29{,}98\,\%$.

Die bei der Karbaminotrennung der Amidosäuren erhaltene dritte Fraktion wurden ebenfalls auf dem Wasserbade eingeengt; hierbei fand schon eine Abscheidung von Kristallen statt. Dieselben wurden abgenutscht und mit eiskaltem Wasser gewaschen, wobei der größte Teil wieder in Lösung ging. Das Filtrat dieser Kristalle wurde wieder eingeengt und mit etwa 100 ccm absolutem Alkohol versetzt. Eine Abscheidung oder Trübung fand hierbei noch nicht statt. Der Zusatz an Alkohol wurde daher fortgesetzt. Trat Trübung ein, so wurde erst nach dem vollkommenen Klarwerden der Flüssigkeit erneut Alkohol hinzugegeben. Nachdem die Abscheidung mit Alkohol beendet war, wurde abgenutscht, mit Alkohol gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Ausbeute 1,6 g.

Das Filtrat wurde weiter mit Äther versetzt, wobei abermals starke Trübung eintrat. Vorsichtig wurde der Ätherzusatz fortgesetzt, wobei darauf Bedacht genommen werden mußte, daß die Abscheidungen nicht verschmierten. Nachdem auf weiteren Ätherzusatz nur noch unwesentliche Trübung eintrat, wurde filtriert, mit Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Ausbeute 2,34 g.

Die einzelnen Abscheidungen wurden vereinigt (4,0 g) und von ihnen der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

0,2198 g Substanz verbrauchten 21,5 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.

$N = 13{,}69\,\%$.

Dieser Stickstoffgehalt entspricht zwar dem der Amidobuttersäure (13,6 % N), doch glaube ich nicht, daß sich diese als Spaltungsprodukt im Pepsinglutinpepton findet, da sie ja auch als Spaltungsprodukt im Glutin selbst bisher noch nicht ge-

funden ist. Vielmehr neigte ich der Ansicht zu, daß hier noch ein Gemisch von Amidosäuren vorliegt. Vielleicht ist es Leucin (N = 10,7 %), das ja auch schon von Neucki[1]) später von E. Fischer[2]) bei der Hydrolyse des Leims gefunden wurde, und welches hier noch durch Glykokoll verunreinigt ist.

Ich versuchte daher ein zweites Mal mit Hilfe der Karbaminoreaktion diese Amidosäuren zu trennen.

3,7 g des Amidosäuregemisches wurden in wenig Wasser gelöst, 500 ccm. kalt gesättigte Barytlösung zugesetzt, in Eis gekühlt, Phenolphtaleïn als Indikator und Kohlensäure bis zur schwach alkalischen Reaktion eingeleitet. Hierauf wurde Baryt in starkem Überschuß hinzugegeben, ca. 4 Stunden im Eise stehen lassen und abgenutscht.

War meine Annahme richtig, daß vorher ein Gemisch von Glykokoll und Leucin vorlag, so mußte jetzt im Niederschlag das Glykokoll, im Filtrat das Leucin zu finden sein.

Der Niederschlag wurde in Wasser suspendiert, in der Wärme mit einem geringen Überschuß von Ammonkarbonat behandelt, filtriert und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mit Alkohol bis zur Trübung versetzt. Der Zusatz an Alkohol wurde nach dem jedesmaligen Klarwerden wiederholt. Nachdem eine Vermehrung der Kristalle nicht mehr eintrat, wurden dieselben abgenutscht, mit Alkohol gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

0,1306 g Substanz gaben 16,7 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
N = 17,90 %.

Dieser Wert für N nähert sich schon sehr dem für Glykokoll.

Zur Überführung der Kristalle ins Kupfersalz wurden sie in Wasser gelöst, mit frisch gefälltem Kupferoxydhydrat erwärmt, filtriert und das Filtrat eingeengt. Ohne Zusatz von Alkohol schied sich das Glykokollkupfer innerhalb 24 Stunden ab.

0,1040 g Substanz verloren bei 110° 0,0082 g an Gewicht.

Berechnet für $(CH_2 \cdot NH_2 \cdot COO)_2Cu + H_2O$:	Gefunden:
$H_2O = 7{,}84\,\%$	$H_2O = 7{,}88\,\%$.

[1]) Neucki, Journ. f. prakt. Chem. **15**, 395 (1877).
[2]) E. Fischer, Ztschr. f. physiol. Chem. **33**, 70 (1902).

0,0958 g der bei 110° getrockneten Substanz hinterließen nach dem Glühen 0,0358 g CuO.

Berechnet für $(CH_2 \cdot NH_2 \cdot COO)_2Cu$:	Gefunden:
$Cu = 30{,}05\,\%$	$Cu = 29{,}86\,\%$.

Das Filtrat der Karbaminotrennung, in dem sich das Leucin befinden mußte, wurde in der Wärme mit Ammonkarbonat behandelt, filtriert und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mit Alkohol versetzt. Noch ehe sich das Leucin abgeschieden hatte, zerbrach mir das Gefäß.

Da mir daran lag, das Leucin als neues Spaltungsprodukt des Pepsinglutinpeptons mit Sicherheit nachzuweisen, so entschied ich mich zu einer neuen Spaltung. Ich verweise daher schon hier auf den dritten Spaltungsversuch.

Das alkoholische Filtrat der Glykokoll-Leucin-Abscheidung gab auf Zusatz von Äther starke Trübung, was auf die Anwesenheit von Pyrrolidinkarbonsäure schließen läßt.

Zur Isolierung derselben wurde das Filtrat auf dem Wasserbade vorsichtig zur Trockne eingedampft und über Schwefelsäure getrocknet.

Die Ausbeute betrug 1,65 g.

Der Rüskstand wurde mit etwa 50 ccm absolutem Alkohol auf dem Wasserbade erwärmt, wobei derselbe mit Ausnahme von geringen Verunreinigungen in Lösung ging. Es wurde filtriert, das Filtrat abermals eingedampft und der Rückstand wieder mit absolutem Alkohol ausgekocht. Diesmal ging der ganze Rückstand klar in Lösung. Bis zur starken Trübung wurde Äther zugesetzt und der Zusatz nach dem jedesmaligen Klarwerden der Flüssigkeit wiederholt. Nach mehrtägigem Stehen im Eisschrank wurde abgenutscht, mit Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Ausbeute 1,0 g.

Zur größeren Reinigung wurden dieselben abermals in Alkohol gelöst und durch Zusatz von Äther wieder ausgeschieden.

Die im 2 dcm-Rohr polarisierte Lösung zeigte starke Linksdrehung, ein Zeichen, daß ein großer Teil der Pyrrolidinkarbonsäure in der aktiven Form vorlag.

Da das Kupfersalz der racemischen Säure gut kristallinisch zu erhalten ist, so versuchte ich dasselbe darzustellen.

Die hier vorliegende aktive Säure wurde in die inaktive Form übergeführt. Die Racemisierung geschah nach den Angaben Fischers.[1]) 0,7 g wurden mit 2 g festem Baryt in 4 g Wasser im Bombenrohr 5 Stunden auf 150° erhitzt. Nach der Fällung des Baryts durch Kohlensäure und Ammonkarbonat wurde das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen, mit frisch gefälltem Kupferoxyhydrat erwärmt, filtriert und die tiefblaue Lösung eingeengt. Aus der konzentrierten Lösung kristallisierte das Kupfersalz gut aus.

Von den Kristallen wurde abgenutscht und dieselben über Schwefelsäure getrocknet. Hierbei verliert das Kupfersalz einen Teil seines Kristallwassers; die bis dahin blauen Kristalle nehmen violette Färbung an, die aber beim Anfeuchten oder schon in feuchter Luft wieder verschwindet. Ein charakteristisches Merkmal für das racemische Pyrrolidinkarbonsäurekupfer.[2])

Die Analyse ergab Werte, die sich mit denen des pyrrolidinkarbonsauren-Kupfers vereinen lassen.

0,1160 g Substanz verloren bei 110° 0,0126 g an Gewicht.

Berechnet für $C_{10}H_{16}N_2O_4 \cdot Cu + 2H_2O$:	Gefunden:
$H_2O = 10{,}98\,\%$.	$H_2O = 10{,}86\,\%$.

0,1034 g der bei 110° getrockneten Substanz gaben 0,1544 g CO_2 und 0,0520 g H_2O und hinterließen nach dem Glühen 0,0288 g CuO.

Berechnet für $C_{10}H_{16}N_2O_4 \cdot Cu$:	Gefunden:
$C = 41{,}09\,\%$	$C = 40{,}73\,\%$
$H = 5{,}49$ „	$H = 5{,}63$ „
$Cu = 21{,}81$ „	$Cu = 22{,}28$ „

Nach dem Umfällen ergaben sich folgende Werte:
0,1058 g Substanz verloren bei 110° 0,0116 g an Gewicht.

Berechnet für $C_{10}H_{16}N_2O_4 \cdot Cu + 2H_2O$:	Gefunden:
$H_2O = 10{,}98\,\%$.	$H_2O = 10{,}96\,\%$.

0,0942 g der bei 110° getrockneten Substanz hinterließen nach dem Glühen 0,0258 g CuO und gaben 0,1412 g CO_2 und 0,0458 g H_2O.

[1]) E. Fischer, Ztschr. f. physiol. Chemie **33**, 167 (1901).

[2]) Vergl. Hoppe-Seyler, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Berlin 1908, S. 263.

Berechnet für $C_{10}H_{16}N_2O_4Cu$:	Gefunden:
Cu = 21,81 %	Cu = 21,88 %
C = 41,09 „	C = 40,89 „
H = 5,49 „	H = 5,44 „

Nach dem Ergebnis der Analyse unterliegt es wohl keinem Zweifel, daß hier die α-Pyrrolidinkarbonsäure vorliegt.

Die Pyrrolidinkarbonsäure wurde zuerst von E. Fischer[1]) unter den Salzsäureabspaltungsprodukten des Kaseins gefunden. Den früheren Beobachtern, die sich mit der Spaltung von Proteinstoffen beschäftigten, ist sie wahrscheinlich wegen ihrer leichten Löslichkeit in Wasser und Alkohol entgangen. Später ist sie dann als Spaltungsprodukt der verschiedensten Eiweißkörper nachgewiesen. So erhielt sie u. a. E. Fischer[2]) bei der Hydrolyse des Leims, Kossel[3]) aus Salnin und Clupein und Winterstein[4]) aus Emmenthaler Käse.

c) III. Spaltungsversuch.

Der III. Spaltungsversuch sollte, wie ja schon vorher bemerkt, in der Hauptsache dazu dienen, das Leucin zu isolieren und so als Spaltungsprodukt des Pepsinglutinpeptons nachzuweisen.

10,0386 g büchsentrocknes Pepton (Darstellung IV) wurden in 80 g Wasser gelöst und mit 40 g konzentrierter Schwefelsäure 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Filtrieren wurde die Spaltungslösung auf 250 ccm aufgefüllt.

In 2 mal je 2,5 ccm wurde der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

I. 2,5 ccm verbrauchten 12,2 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4
II. 2,5 „ „ 12,3 „ „ „
Im Mittel: 12,25 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4

entsprechend 0,0172 g N.

250 ccm verbrauchten 1225 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4, entsprechend 1,7150 g N.

---

[1]) E. Fischer, Ztschr. f. physiol. Chem. **33**, 151 (1901).
[2]) E. Fischer, F. A. Levene u. R. H. Aders, ebenda **35**, 70 (1902).
[3]) A. Kossel, ibid. **41**, 414 (1904).
[4]) E. Winterstein, ibid. **41**, 500 (1904).

Da der Stickstoffgehalt des zur Spaltung verwendeten Peptons (Darstellung IV) 17,6 % betrug, so entsprechen diese 1,7150 g N einem Trockengehalt an Pepton von 9,7443 g.

Um der auf 250 ccm aufgefüllten Lösung einen Gehalt an Schwefelsäure von 5 % zu verleihen, wurde sie auf 784 ccm aufgefüllt und hierauf mit 10 % (50 ccm) und 30 % (100 ccm) Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Auf dem Wasserbade wurde erwärmt, bis der größte Teil des Niederschlages in Lösung gegangen war, nach 16 Stunden bei 20° Temperatur abgesaugt und mit 100 ccm 5 %iger Phosphorwolframsäure- und 5 %iger Schwefelsäurelösung nachgewaschen.

Da sich das Leucin im Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlages befindet, so wurde der Niederschlag zunächst unberücksichtigt gelassen und nur das Filtrat weiter verarbeitet.

Das Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlages.

Die im Filtrat enthaltene Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure wurde mit Baryt zersetzt, dieser dann mit Ammonkarbonat gefällt und das Filtrat auf dem Wasserbade soweit wie möglich eingeengt.

Bis hierher entsprach der Gang der Untersuchung genau dem der vorhergehenden Spaltung. Da sich aber bei ihr die Isolierung der Glutaminsäure und des Glykokolls als schwierig und zeitraubend erwiesen hatte, es mir hier aber nicht mehr auf deren Nachweis, sondern nur auf ihre Entfernung ankam, so suchte ich nach einem neuen Wege, auf dem sich dies in möglichst einfacher Weise erreichen läßt.

Am vorteilhaftesten erschien mir die auch schon bei der letzten Spaltung mit Erfolg angewandte Trennung der Aminosäuren mit Hilfe der Karbaminoreaktion.

Wie sich Glykokoll bei dieser verhält, war ja nach den Befunden M. Siegfrieds[1]) bekannt. Unbestimmt war aber das Verhalten der Glutaminsäure. Mir kam es darauf an, auch von dieser eine schnelle quantitative Trennung zu erreichen.

Geht bei der Karbaminierung die Glutaminsäure ebenso wie das Glykokoll quantitativ in den Niederschlag, so ist eine Trennung

[1]) M Siegfried, Berl. Ber. **39**, 297 (1906).

von Glutaminsäure und Glykokoll einerseits und den übrigen in der Spaltungslösung befindlichen Amidosäuren leicht erreichbar.

Die Karbaminotrennung wurde in folgender Weise ausgeführt.

Der durch Einengen auf dem Wasserbade erhaltene Rückstand des zersetzten Filtrates vom Phosphorwolframsäureniederschlag wurde in wenig Wasser aufgenommen, in eine ca. 1 l fassende Stopfenflasche gespült und 600 ccm kalt gesättigte Barytlösung zugesetzt. Bei guter Eiskühlung wurde unter ständigem Umschwenken des Gefäßes so lange Kohlensäure eingeleitet, bis das als Indikator zugesetzte Phenolphtalein nur noch schwach gefärbt war. Hierauf wurde die Lösung nochmals mit festem feingepulvertem Baryt gesättigt (30 g) und unter denselben Bedingungen wie vorher Kohlensäure eingeleitet. Der abgeschiedene Niederschlag war größtenteils ein dicker flockiger Brei von Glykokollkarbaminat, eventuell auch mit von Glutaminsäurekarbaminat. Der Niederschlag (A) wurde abgenutscht und mit in Eis gekühltem gesättigtem Barytwasser gewaschen.

Das Filtrat (600 ccm) wurde mit Baryt gesättigt (30 g) und wieder Kohlensäure bis zum Verschwinden der roten Farbe eingeleitet. Der hierbei gebildete Niederschlag war dem Aussehen nach nur Baryumkarbonat. Um jedoch sicher zu sein, alles Glykokoll zur Abscheidung gebracht zu haben, wurden nochmals 15 g Baryt eingetragen und wiederum Kohlensäure eingeleitet. Nachdem Entfärbung des Phenolphtaleins eingetreten war, wurde ein größerer Überschuß an Baryt zugegeben, heftig umgeschwenkt, vom Niederschlag (B) abgenutscht und derselbe mit eiskalter Barytlösung gewaschen.

Die Niederschläge (A und B) wurden vereinigt, in Wasser suspendiert, in der Wärme mit Ammonkarkonat zersetzt, filtriert und das Filtrat auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft.

Der Rückstand, (der jetzt nur das Glykokoll und eventuell die Glutaminsäure enthält) wurde in Wasser gelöst und die Lösung auf 200 ccm aufgefüllt.

In 5 ccm wurde der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

5 ccm verbrauchten 17,3 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4, entsprechend 0,0242 g N.

200 ccm verbrauchen 692 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4, entsprechend 0,9688 g N = 56,49% des Gesamtstickstoffs.

Schon der hohe Stickstoffgehalt (der ganze durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Stickstoff beträgt 68%) zeigt, daß hier Glykokoll allein nicht vorliegen kann.

Eine Probe der auf 200 ccm aufgefüllten Lösung ergab dann auch, auf Glutaminsäure geprüft die sichere Anwesenheit derselben.

Der Rest der Lösung (170 cm) wurde mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und die Glutaminsäure durch abwechselnden allmählichen Zusatz von Silbernitratlösung und ammoniakalischer Silbernitratlösung gefällt. Das glutaminsaure Silber wurde abgenutscht, mit Alkohol und Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet. Ausbeute: 3,4180 g.

Wäre die ganze auf 200 ccm aufgefüllte Lösung auf glutaminsaures Silber verarbeitet worden, so hätte sich eine Ausbeute von 4,0212 ergeben. Da sich der Stickstoffgehalt des glutaminsauren Silbers auf 3,88% berechnet, so entsprechen diese 4,0212 g 0,1559 g N. Der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Stickstoff beträgt (68% des Gesamtstickstoffes angenommen) 1,1662 g. Mithin entfallen hier von dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoff 13,36% auf den Glutaminsäurestickstoff.

Der bei der vorhergehenden Spaltung gefundene Wert betrug 10,39%. Hier wurde 13,36% gefunden, ein Beweis, daß die Abscheidung der Glutaminsäue mit Hilfe der Karbaminomethode noch bessere Resultate gibt, als die allgemeine geübte Methode der Abscheidung der Glutaminsäurechlorhydrate.

Da sich, wie ich später zeigen werde, das Filtrat der Karbaminotrennung vollkommen frei von Glutaminsäure erwies, so kann man hiernach annehmen, daß bei einer Trennung von Aminosäuren durch die Karbaminoreaktion, die Glutaminsäure ebenso wie das Glykokoll, quantitativ in den Niederschlag geht.

Zur Überführung in das Chlorhydrat wurde das glutaminsaure Silber in Wasser suspendiert, durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zersetzt und der Schwefelwasserstoff durch Hindurchleiten von Luft aus der Flüssigkeit entfernt. Aus dem auf dem Wasserbade eingeengten Filtrat wurde das Chlorhydrat durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure in der Kälte abgeschieden. Nach mehrtägigem Stehen im Eisschrank wurde über Glaswolle abgesaugt und über Ätzkali getrocknet.

Ausbeute: 1,65 g.

Das Leucin und Pyrrolidinkarbonsäure enthaltende Filtrat der Karbaminotrennung wurde in der Wärme mit Ammonkarbonat behandelt, dann vom gebildeten Bariumkarbonat abgesaugt, gut mit warmem Wasser gewaschen und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Leucin enthaltende Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und die Lösung auf die Anwesenheit von Glutaminsäure geprüft. War das, was ich vorher über das Verhalten der Glutaminsäure bei der Karbaminotrennung gesagt hatte, richtig, so durfte sich hier Glutaminsäure nicht mehr nachweisen lassen. Auf Zusatz von Silbernitratlösung und ammoniakalischer Silbernitratlösung schieden sich denn auch nur einige unwägbare Flöckchen ab. Von diesen wurde filtriert, im Filtrat das Silber durch Einleiten von Schwefelwasserstoff gefällt und das Filtrat des Schwefelsilbers zur Trockne eingedampft.

Der Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und anfangs mit Alkohol, später mit Äther bis zur jedesmaligen Trübung versetzt. Als auf weiteren Ätherzusatz ein Verschmieren der Abscheidung eintrat, wurde abgesaugt, mit Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Das Filtrat dieser Leucinabscheidung wurde auf dem Wasserbade wieder eingeengt, und der dickflüssige Sirup in etwa 150 ccm absoluten Alkohol eingegossen. Im Verlaufe von etwa 14 Tagen hatten sich neben Schmieren auch runde Knöllchen abgeschieden, die unter dem Mikroskop als Kristalle erkannt wurden. Sie wurden abgesaugt, mit Alkohol gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Beide Abscheidungen wurden vereinigt (1,35 g) und um zu sehen ob die Amidosäure in der aktiven Form vorlag, versucht, dieselbe im 20 ccm-Kölbchen in Wasser zu lösen. Jedoch ging bei diesem Versuch, auch beim Erwärmen auf dem Wasserbade, nicht alles in Lösung. Es wurde filtriert und die klare Lösung im 2 dcm Rohr polarisiert. Schwache Linksdrehung war wahrzunehmen. Die Aminosäure war also zum Teil in der aktiven Form vorhanden.

Da Leucin leicht racemisiert wird, so wurde die zur Polarisation gedient habende Lösung auf dem Wasserbade wieder eingeengt. der Rückstand mit heiß gesättigter Barytlösung in einen Erlenmeyer gespült und in demselben längere Zeit am Rückflußkühler

erhitzt. Der überschüssige Baryt wurde durch Ammonkarbonat gefällt, dann vom Bariumkarbonat filtriert, gut gewaschen und das Filtrat eingeengt. Da die hierbei abgeschiedenen Kristalle immer noch durch geringe Schmieren verunreinigt waren, so wurden sie wieder in heißem Wasser gelöst und mit Tierkohle gekocht. Das Filtrat wurde eingeengt und nochmals mit Tierkohle gereinigt. Beim Einengen des nunmehr farblosen Filtrates schieden sich schöne blättchenförmige Kristalle aus. Es wurde bis fast zur Trockne eingedampft, von den Kristallen abgenutscht, dieselben mit Alkohol gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

0,2 g wurden im 20 ccm Kölbchen in 20% Salzsäure gelöst und polarisiert. Drehung war nicht mehr wahrzunehmen. Erhitzen am Rückflußkühler mit gesättigter Barytlösung hatte also zur vollkommenen Racemisierung genügt.

Die erhaltenen Analysenwerte stimmen auf Leucin.

0,0862 g Substanz verbrauchten 6,75 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4.
0,1014 g „ gaben 0,2034 g CO_2 und 0,0894 g H_2O.

Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$:	Gefunden:
N = 10,69%	N = 10,96%
C = 54,96%	C = 54,71%
H = 9,92%	H = 9,86%

Der Schmelzpunkt lag bei 265°.

Da Leucin bei den meisten hydrolytischen Zersetzungen der Proteinstoffe gefunden ist, so kann ich, da die Analysenwerte und das Aussehen der Kristalle (zunächst in runden Knollen vereinigt, dann schwer benetzbare Blättchen) auf Leucin hinweisen, dasselbe auch als Spaltungsprodukt im Pepsinglutinpepton annehmen.

Das alkoholische Filtrat der Leucinabscheidung wurde auf dem Wasserbade bis zum dickflüssigen Sirup eingedampft, der dann im Verlaufe einiger Tage teilweise zu Kristallen erstarrte. Nach dem Ergebnis der vorhergehenden Spaltung war dies in der Hauptsache wohl α-Pyrrolidinkarbonsäure. Um eine Trennung desselben von etwa noch vorhandenem Leucin herbeizuführen, wurde der Rückstand in Wasser gelöst, mit frisch gefälltem Kupferoxyd gekocht und das dunkelblaue Filtrat auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Nach den Befunden F. Ehrlichs[1])

[1]) F. Ehrlich, Biochemische Zeitschrift **8**, 399 (1908).

ist Leucinkörper in Methylalkohol vollkommen unlöslich. Beim Extrahieren des hier vorliegenden Kupfersalzes mit Methylalkohol ging alles bis auf Spuren in Lösung. Ein Zeichen, daß hier wesentliche Mengen von Leucin nicht mehr vorhanden waren, resp. daß der Rückstand wohl nur noch aus pyrrolidinkarbonsaurem Kupfer bestanden hatte.

Da ich bei der vorhergehenden Spaltung den Nachweis der α-Pyrrolidinkarbonsäure schon erbracht habe, es auch wohl nicht anzunehmen war, daß der Rückstand (1,5 g Kupfersalz) noch eine andere Amidosäure enthalten würde, so habe ich eine Reinigung und Untersuchung des Kupferrückstandes hier nicht mehr für nötig erachtet, und denselben als unreines α-pyrrolidinkarbonsaures Kupfer angesehen.

d) Ergebnisse der Spaltungen.

Unter den Spaltungsprodukten des Pepsinglutinpeptons durch Schwefelsäure sind, außer den bisher gefundenen Lysin, Arginin, Glutaminsäure und Glykokoll, jetzt sicher nachgewiesen Leucin und α-Pyrrolidinkarbonsäure.

Vom Leucin und der α-Pyrrolidinkarbonsäure war neben der aktiven auch die racemische Form vorhanden; es ist aber anzunehmen, daß bei der Hydrolyse letztere aus der ersteren entsteht.

Die Mengen der bei der Spaltung des Pepsinglutinpeptons entstehenden Spaltungsprodukte und ihr Stickstoffgehalt bezogen auf das jedesmal angewandte Pepton lassen sich hier nach dem Ergebnis der Untersuchung wie folgt berechnen:

I. Bei dem 3. Spaltungsversuch war mit Hilfe der Siegfriedschen Methode (Karbaminotrennung) eine Trennung und zum Teil auch eine Isolierung der im Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlages befindlichen Aminosäuren durchgeführt worden. Hierbei hatte sich gezeigt, daß neben Glykokoll auch Glutaminsäure quantitativ gefällt wird, während die übrigen Aminosäuren Leucin und α-Pyrrolidinkarbonsäure im Filtrat bleiben.

Der Stickstoffgehalt der Glykokoll-Glutaminsäurefraktion betrug 0,9688 g = 56,49 % des Gesamtstickstoffs (s. Seite 70).

Die als glutaminsaures Silber isolierte Glutaminsäure enthielt 0,1559 g Stickstoff = 9,04 % des Gesamtstickstoffs.

Nach dem Ergebnis des zweiten Spaltungsversuches ist es nicht wahrscheinlich, daß sich in dieser Fraktion neben Glykokoll und Glutaminsäure noch eine andere Aminosäure findet. Ist Glykokoll allein vorhanden, so kommt daher nach Abzug der 9,04 % für Glutaminsäurestickstoff der Rest von 47,45 % des Gesamtstickstoffs, entsprechend 0,8137 g Stickstoff, dem Glykokoll zu.

Lassen wir jedoch die Möglichkeit offen, daß sich hier neben Glykokoll und Glutaminsäure noch eine andere Aminosäure findet, die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar ist, die bei der Karbaminotrennung in den Niederschlag geht, durch ammoniak. Silbernitrat aber nicht gefällt wird, so würde dies für die prozentuale Verteilung des Stickstoffs insofern ohne große Bedeutung sein, als sich dann Glykokoll und die betreffende Aminosäure in diesen Stickstoff von 47,45 % teilen würden. Der Hauptanteil würde natürlich dem Glykokoll zukommen, da dieses nach dem Ergebnis des 2. Spaltungsversuches in ungleich größerer Menge auftritt wie die eventuell noch zu findende Aminosäure.

Der Stickstoffgehalt des Glykokolls berechnet sich zu 18,67 %; es entsprechen also die ihm zukommenden 0,8137 g Stickstoff 4,3580 g Glykokoll = 44,72 % der angewandten Peptonmenge (9,7443 g).

II. Schon oben war gesagt, daß der Glutaminsäurestickstoff 0,1559 g = 9,04 % des Gesamtstickstoffs betrug. Da sich der Glutaminsäurestickstoff zu 9,52 % berechnet, so entsprechen 0,1559 g Stickstoff 1,6376 g Glutaminsäure = 16,81 % des angewandten Peptons (9,7743 g).

III. Bei dem zweiten Spaltungsversuch war auch das Arginin-Lysinverhältnis festgestellt worden. Der Argininstickstoff betrug 0,6375 g = 18,93 % des Gesamtstickstoffs (s. S. 52). Arginin hat 32,18 % Stickstoff, es entsprechen 0,6375 g Stickstoff also 1,8910 g Arginin = 10,02 % des angewandten Peptons (19,7687 g).

IV. Der Lysinstickstoff war zu 0,2870 g = 8,39 % des Gesamtstickstoffs gefunden worden (S. 52). Da der Stickstoffgehalt des Lysins sich zu 19,15 % berechnet, so entsprechen 0,2870 g Stickstoff 1,4887 g Lysin = 7,58 % des angewandten Peptons (19,7687 g).

V. Bei dem dritten Spaltungsversuch (S. 72) betrug die durch Zusatz von absolutem Alkohol bewirkte Abscheidung von Roh-Leucin 1,35 g = 13,85 % des angewandten Peptons (0,7443 g).

Da der Stickstoffgehalt des Leucins sich zu 10,69 % berechnet, so entsprechen 1,35 g Leucin 0,1443 g Stickstoff = 7,68 % des Gesamtstickstoffs (1,7150 g).

VI. Der nach Isolierung von Arginin, Lysin, Glykokoll, Glutaminsäure und Leucin noch verbleibende kristallinische Rest, der sich als in Alkohol leicht löslich, in Äther aber unlöslich erwies, und dementsprechend als Roh-α-Pyrrolidinkarbonsäure angesehen wurde (S. 66), wog nach dem Trocknen über Schwefelsäure 1,65 g = 8,37 % des angewandten Peptons (19,7687 g).

Der Stickstoffgehalt der α-Pyrrolidinkarbonsäure berechnet sich auf 12,12 %. Es entsprechen also 1,65 g 0,2006 g Stickstoff = 5,87 % des Gesamtstickstoffs (3,4202 g).

Zusammenstellung der Resultate.

Amidosäure	% N der einzelnen Spaltungsprodukte	Menge der Spaltungsprodukte in %
Glykokoll (?)	47,45	[44,72][1])
Glutaminsäure	9,04	16,81
Arginin	18,93	10,02
Lysin	8,39	7,58
Leucin	7,68	13,85
α-Pyrrolidinkarbonsäure	5,87	8,37
% statt 100	97,36	101,35

Hierzu ist noch zu bemerken, daß bei einer Spaltung die Menge der Spaltungsprodukte stets wesentlich mehr wie 100 % der angewandten Substanz betragen muß, da bei der letzteren ja das Wasser nicht mit in Betracht gezogen ist.

Geht bei einer Spaltung eines Proteinkörpers diese in Form einer einfachen Hydrolyse vor sich, entstehen also glatt die einzelnen Komponenten, so zeigen uns hier die Spaltungsprodukte; daß das Molekül des Pepsinglutinpeptons größer sein muß, als sich aus dem Äquivalentgewicht ergibt.

[1]) Diese Zahl kommt eventuell dem Glykokoll gemeinsam mit einer anderen noch zu findenden Aminosäure zu.

Zusammenfassende Übersicht.

1. Bei der Verdauung der Gelatine zeigte sich, daß sich bei der Pepsinverdauung durch einen ständig größeren Zusatz von Salzsäure auch eine bessere Ausbeute an Pepton erzielen lasse.

2. Zur Identifizierung wurde die optische Drehung, die prozentuale Zusammensetzung und der Metallgehalt des Barytsalzes bestimmt.

3. Aus der Analyse berechnet sich als einfachste Formel für das Pepsinglutinpepton $C_{23}H_{39}N_7O_{10}$. Die Analyse des Barytsalzes und der Derivate mit β-Naphtalinsulfochlorid und 4-Nitrotoluol-2-sulfochlorid bestätigten diese Formel.

4. Eine gute Fraktionierung des Peptons ließ sich durch die Fällung desselben als Bariumkarbaminat erreichen. Die einzelnen Fraktionen zeigten sich sowohl in chemischer als in physikalischer Hinsicht dem ursprünglichen Pepton vollkommen gleich, wodurch ein neuer Beweis für die Einheitlichkeit des Pepsinglutinpeptons erbracht wurde. Im Gegensatz hierzu wurde gezeigt, daß bei der Fraktionierung eines Peptongemisches Übereinstimmung der Werte des Peptons aus den einzelnen Fraktionen nicht erhalten werden kann.

5. Die Bestimmung des Quotienten $CO_2 : N$ bei dem Karbaminosalz ergab das konstante Verhältnis 1 : 7. Hierdurch ist, außer einem neuen Beweis für die Einheitlichkeit des Peptons, auch ein neuer Anhalt für die Bindung des Stickstoffs innerhalb des Peptonmoleküls gegeben.

6. Durch Bestimmung des CO_2 : N-Verhältnisses für die Spaltungprodukte konnte schon ein Rückschluß auf die Art derselben gezogen werden.

7. Wie jede andere Amidosäure, so bildet auch das Pepsinglutinpepton mit β-Naphtalinsulfochlorid und 4-Nitrotoluol-2-sulfosäurechlorid wohl charakterisierte Derivate. Eine Spaltung derselben in der Weise, daß die aus dem Pepton gebildeten

Spaltungsprodukte sich mit den Sulfosäurechloriden zu neuen Derivaten vereinigen würden, konnte nicht festgestellt werden.

8. Die Bestimmung der Stickstoffverteilung innerhalb des Peptonmoleküls geschah nach der von M. Siegfried verbesserten Hausmannschen Methode.

9. Die quantitativen Spaltungen setzten das Verhältnis Lysin : Arginin fest. Sie ergaben ferner Werte für die Mengen der bei der Spaltung gebildeten Amidosäuren. Von neuen Spaltungsprodukten konnten Leucin und α-Pyrrolidinkarbonsäure nachgewiesen werden.

10. Bei der Isolierung der Amidosäuren aus der Spaltungslösung erwies sich die Trennung mit Hilfe der M. Siegfriedschen Karbaminoreaktion als ein gutes und vor allen Dingen als ein recht schnell zum Ziele führendes Mittel. Es konnte gezeigt werden, daß bei derselben auch Glutaminsäure quantitativ gefällt wird.

10. Zum Schluß wurde an Hand der Spaltungen eine genaue Zusammenstellung der Mengen der bei der Spaltung des Pepsinglutinpeptons entstehenden Aminosäuren und des ihnen zukommenden Stickstoffs gegeben. Eine so hohe Prozentzahl in bezug auf den angewandten Proteinkörper ist bisher noch nicht erzielt worden.

Vita.

Ich, Heinrich Schmitz, katholischer Konfession, geboren am 10. März 1885 zu Elberfeld, besuchte die Oberrealschule in Barmen bis zur Obersekunda und trat dann in die Oberrealschule in Rheydt ein, welche ich Ostern 1904 mit dem Zeugnis der Reife verließ.

Hierauf bezog ich die Universität Marburg, von Ostern 1906 ab die Universität Leipzig, woselbst ich auch das für Chemiker vorgeschriebene Verbandsexamen ablegte.